

СЫКТЫВКАРСКИЙ ЛЕСНОЙ ИНСТИТУТ

КАФЕДРА ВОСПРОИЗВОДСТВА ЛЕСНЫХ РЕСУРСОВ



ОСНОВЫ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

**Сборник описаний лабораторных работ
для подготовки дипломированного специалиста
по направлению 656600 «Защита окружающей среды»
специальности 280201 «Охрана окружающей среды
и рациональное использование природных ресурсов»
очной и очно-заочной форм обучения**

СЫКТЫВКАР 2007

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
СЫКТЫВКАРСКИЙ ЛЕСНОЙ ИНСТИТУТ – ФИЛИАЛ
ГОСУДАРСТВЕННОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ЛЕСОТЕХНИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. М. КИРОВА»

КАФЕДРА ВОСПРОИЗВОДСТВА ЛЕСНЫХ РЕСУРСОВ

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Сборник описаний лабораторных работ
для подготовки дипломированного специалиста
по направлению 656600 «Защита окружающей среды»
специальности 280201 «Охрана окружающей среды
и рациональное использование природных ресурсов»
очной и очно-заочной форм обучения

СЫКТЫВКАР 2007

УДК 579.6
ББК 30.16
О-75

Рассмотрен и рекомендован к изданию на заседании кафедры воспроизводства лесных ресурсов 14 октября 2006 г. (протокол № 2).

Утвержден к печати методическим советом технологического факультета 27 октября 2006 г. (протокол № 3).

Составитель:

Ф. М. Хабибуллина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

О-75 **ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ** : сб. описаний лабораторных работ для подготовки дипломированного специалиста по направлению 656600 «Защита окружающей среды» спец. 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» оч. и оч.-заоч. форм обуч. / Ф. М. Хабибуллина ; СЛИ. – Сыктывкар, 2007. – 36 с.

УДК 579.6
ББК 30.16

В издании даны описания лабораторных работ по дисциплине «Основы микробиологии и биотехнологии», каждое из которых включает цель выполнения работы, обеспечивающие средства, задание, технологию ее выполнения, требования к отчету, контрольные вопросы и список рекомендуемой литературы. Предназначено для студентов специальности 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» очной и очно-заочной форм обучения.

Темплан 2006/07 учеб. г. Изд. № 70.

* * *
Учебное издание

Составитель ХАБИБУЛЛИНА Флюза Мубараковна

ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Сборник описаний лабораторных работ для подготовки дипломированного специалиста по направлению 656600 «Защита окружающей среды» специальности 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» очной и очно-заочной форм обучения

Сыктывкарский лесной институт – филиал государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная лесотехническая академия имени С. М. Кирова» (СЛИ)
167982, г. Сыктывкар, ул. Ленина, 39
institut@sfi.komi.com, www.sli.komi.com

Подписано в печать 08.05.07. Формат 60 × 90 1/16. Усл. печ. л. 2,2. Тираж 26. Заказ №

Редакционно-издательский отдел СЛИ.
Отпечатано в типографии СЛИ

© Ф. М. Хабибуллина, составление, 2007
© СЛИ, 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Лабораторная работа № 1. ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. МИКРОСКОПИЯ.....	5
Лабораторная работа № 2. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ	6
Лабораторная работа № 3. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЖИВЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ.....	9
Лабораторная работа № 4. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	12
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА <i>Eubacteriales</i> ...	12
Лабораторная работа № 5. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАСКА МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ГРАММУ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ.....	15
Лабораторная работа № 6. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ...	17
Лабораторная работа № 7. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	20
Лабораторная работа № 8. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ СЧЕТНЫХ КАМЕР	23
Лабораторная работа № 9. АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ БАКТЕРИЙ В ВОДЕ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА И ИНДЕКСА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ В ВОДЕ.....	27
Лабораторная работа № 10. ЗНАКОМСТВО С МИКРООРГАНИЗМАМИ ПОЧВЫ.....	31
Лабораторная работа № 11. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ	34
Лабораторная работа № 12. КОЛЛОКВИУМ	36

ВВЕДЕНИЕ

Целью проведения лабораторных работ является закрепление теоретических знаний курса, полученных студентами на лекциях и в ходе самостоятельной работы.

Задача изучения дисциплины состоит в том, чтобы студенты овладели необходимыми теоретическими и практическими знаниями в области микробиологии, дающими необходимую основу для ведения комплексного лесного хозяйства и сохранения лесного генофонда.

В соответствии с учебной программой студенты выполняют двенадцать лабораторных работ, описание которых приведено в данном сборнике. В ходе выполнения работы студенты ведут необходимые записи и в ряде случаев зарисовки. Для этого нужно иметь тетрадь, ручку, карандаш, ластик. В конце занятия сдают все материалы преподавателю и получают зачет по выполненной работе.

Перед выполнением лабораторной работы студент должен ознакомиться с теоретическим материалом, четко представлять себе цель занятия и порядок выполнения работы. Тематика лабораторных работ включает методы микробиологических исследований. Для выполнения некоторых лабораторных работ студенты должны иметь навыки работы с микроскопом.

Сборник описаний лабораторных работ предназначен для студентов специальности 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» очной и очно-заочной форм обучения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

2 часа

ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. МИКРОСКОПИЯ

Цель работы: знакомство с правилами работы при выполнении микробиологического практикума, с устройством микроскопа.

Задача работы: ознакомление с помещением учебной микробиологической лаборатории и оснащением рабочего места; с охраной труда и техникой безопасности; изучение устройства микроскопа, правил пользования им при иммерсионной системе.

Обеспечивающие средства: микроскоп, осветитель, иммерсионное масло, набор объективов, окуляров, готовые препараты различных по форме и величине микроорганизмов, штатив с пробирками, бактериологическая петля, пастеровские пипетки, пинцет, скальпель, вата, дезинфицирующий раствор, промывалка, лоток с мостиком, набор красок, предметные и покровные стекла, мыло, спички, салфетки, фильтровальная бумага, бумажка для установки освещения микроскопа.

Задания

1. Ознакомиться с помещением учебной микробиологической лаборатории и оснащением рабочего места, с охраной труда и техникой безопасности.
2. Изучить устройство микроскопа, правила пользования им при иммерсионной системе.
3. Установить освещение по Келеру.
4. Просмотреть готовые окрашенные мазки с помощью сухого и иммерсионного объектива. Микрокартину зарисовать.

Требования к отчету

1. Описать охрану труда и технику безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Описать устройство микроскопа, правила пользования им при иммерсионной системе.

Технология работы

Знакомство с микроскопом проводится показом отдельных его частей и демонстрацией техники его работы. Следует обратить особое внимание на установку правильного освещения микроскопа. Освещение устанавливают по методу Келера. Для этого:

- а) необходимо предварительно подготовить микроскоп и осветитель, поставить микроскоп и осветитель на крестовину, на предметный столик поместить препарат, установить объектив $\times 8$, конденсор поднять до упора, отодвинуть матовое стекло и открыть диафрагму конденсора, поставить плоское зеркало и закрыть диафрагму осветителя;

- б) включить и сфокусировать изображение витка нити лампы осветителя на зеркале, предварительно положив на зеркало бумагу;
- в) глядя в окуляр, поворачивать зеркало и поймать в поле зрения светлое пятно, сфокусировать при таком освещении препарат;
- г) опуская конденсор, добиться четкого изображения отверстия диафрагмы осветителя и центрировать с помощью зеркала это изображение;
- д) открыть диафрагму осветителя так, чтобы светлый круг занял все поле зрения. Яркость поля зрения можно уменьшить, используя реостат или вводя матовое стекло (После этого ни конденсор, ни осветитель не передвигать!);
- е) поставить объектив $\times 40$ и сфокусировать препарат. (Контрастность изображения можно увеличить, несколько прикрывая диафрагму конденсора.)

Препарат, установленный на столик, закрепляют зажимами, просматривают его с помощью сухого объектива и, отыскивая лучшее место для детального исследования, поднимают тубус микроскопа; с помощью револьвера устанавливают иммерсионный объектив; наносят палочкой иммерсионное масло на препарат; погружают в иммерсионное масло фронтальную линзу иммерсионного объектива, наблюдая сбоку за тем, чтобы не раздавить объективом препарат и не повредить линзы объектива; глядя в окуляр, медленно поднимают тубус микрометрическим винтом до появления в поле зрения микроскопа изучаемого объекта; уточняют фокус микрометрическим винтом и изучают полученный препарат; после работы тубус поднимают, убирают препарат, удаляют иммерсионное масло с объектива, выключают осветитель, закрывает микроскоп чехлом.

Контрольные вопросы

1. В чем заключаются правила работы в бактериологической лаборатории?
2. Для какой цели служит бокс?
3. Как установить освещение микроскопа по методу Келера?
4. Как установить препарат для наблюдений?

Библиографический список

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. Аристовская, Т. В. Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Генкель, П. А. Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

4 часа

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Цель работы: ознакомление студентов методами стерилизации, используемых в микробиологии.

Задача работы: ознакомиться с работой автоклава, сушильного шкафа и фильтров для холодной стерилизации.

Обеспечивающие средства: пипетки градуированные разные, чашки Петри, шпатели Дригальского, пробирки обычные, колбы разные, ножницы, штатив для пробирок, вата для изготовления пробок, марля, бумага для завертывания стеклянной посуды., бумага, нарезанная полосками для завертывания пипеток, автоклав, аппарат Коха, монтаж фильтра Зейтца.

Задание

1. Ознакомиться с работой автоклава, сушильного шкафа и фильтров для холодной стерилизации.
2. Завернуть в бумагу чашки Петри, пипетки, шпатели Дригальского и приготовить к стерилизации.
3. Приготовить к стерилизации воду в пробирках. В каждую пробирку налить 9 мл.
4. Приготовить ватные пробки для пробирок и колб.
5. Приготовить к стерилизации материалы, поместить в автоклав и простерилизовать.
6. Ознакомление с устройством фильтра Зейтца.

Требования к отчету: описать правила работы с автоклавом, сушильного шкафа, устройство фильтра Зейтца.

Технология работы

Стерилизация – это полное уничтожение микроорганизмов, их спор и всего живого в питательных средах, материале, посуде, инструментах и других предметах лабораторного обихода.

Стерилизация осуществляется различными приемами и является непременным условием успешной работы микробиолога и при использовании питательных сред, инструментов и посуды, свободных от посторонних микроорганизмов.

Наиболее часто применяются химическая и физическая стерилизация.

Химическая стерилизация основана на губительном действии химических веществ на микроорганизмы. Она применяется для обработки вакцин, сывороток и других биопрепаратов, консервируемых различными антисептиками.

Химические вещества применяются также для уничтожения патогенных (болезнетворных) микробов в объектах внешней среды: на рабочем месте в помещениях, в рабочей одежде, на руках и т. д. В этих случаях говорят о **дезинфекции**. Для дезинфекции применяют: 3–5 %-й раствор хлорной извести, 0,5–3 %-й – хлорамина, растворы иода, сулемы и т. д.

К *физическим методам стерилизации* относятся: стерилизация высокой температурой, ультрафиолетовыми лучами, радиоактивными излучением, ультразвуком, холодная стерилизация через специальные бактериальные фильтры.

Самым надежным и наиболее распространенным методом физической стерилизации является стерилизация высокой температурой. Она проводится прокаливанием предметов на пламени горелки (фламбирование), кипячением, сухим жаром (горячим воздухом), прогретым паром под давлением и текучим паром. Стерилизацию проводят под давлением в специальных приборах – автоклавах обычно при давлении 1 атм (сверхнормального атмосферного), что соответствует 126 °С. В отдельных случаях при сильном заспорении материала устойчивыми к температуре формами микроорганизмов стерилизация проводится при повышенном давлении до 2 атм, что соответствует 134,18 °С. Продолжительность стерилизации зависит от состава стерилизуемого объекта и степени его бактериального загрязнения и колеблется от 30 мин до 1–1,5 ч.

Стерилизуют в автоклаве питательные среды, лабораторную посуду, перевязочный материал, халаты, хирургические инструменты, отработанные культуры.

Студенты знакомятся с методами и последовательностью работы при стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и других материалов в печи Пастера, аппарате Кока и автоклаве. Каждый студент заворачивает в бумагу 5 чашек Петри, 5 градуированных пипеток для стерилизации, шпатели Дригальского.

Два студента в присутствии группы готовят автоклав к работе, наливают воду, загружают предназначенный для стерилизации, материал в камеру, закрывают и закрепляют винтом крышку автоклава, открывают паровыпускной канал, включают обогрев, выпускают воздух, закрывают кран, доводят давление до 1 атм, выдерживают материал при этом давлении 30 мин, выключают обогрев, охлаждают автоклав и извлекают из него простерилизованный материал.

Контрольные вопросы

1. Что такое стерилизация и какими способами ее осуществляют?
2. Как приготовить стеклянную посуду к стерилизации?
3. Опишите устройство и режим работы автоклава.
4. Что такое стерилизация текучим паром?
5. С какой целью производят дробную стерилизацию?
6. Что такое химическая стерилизация и где ее используют?
7. Что такое биологическая стерилизация и как ее осуществляют?

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

2 часа

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЖИВЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Цель работы: знакомство с техникой приготовления мазков и с методами окраски

Задача работы: освоить методы приготовления препаратов микроорганизмов в живом и фиксированном состоянии, окраски препаратов.

Обеспечивающие средства: микроскоп с осветителем, предметные и покровные стекла, бактериологическая петля, капельница с дистиллированной водой, пробирка с физиологическим раствором, культуры микроорганизмов на жидкой и плотной питательной среде, красители, вазелин, пипетки, бактериологическая игла, стеклянный мостик, ванночка, пинцет.

Задания

1. Обработать и приготовить предметные и покровные стекла.
2. Приготовить препараты микроорганизмов в живом и фиксированном состоянии.
3. Окрасить препараты, просмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради.

Требования к отчету

1. Описать методы приготовления препаратов микроорганизмов в живом и фиксированном состоянии.
2. После просмотра под микроскопом окрашенных препаратов зарисовать их в тетради.

Технология работы

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом необходимо соответствующим образом приготовить препарат на предметном стекле. Предметные стекла должны иметь толщину, не превышающую 1,2–1,4 мм. Применение бо-

лее толстых стекол не позволяет получить резкое изображения краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата, т. е. нарушает фокусировку конденсора. Также чрезмерная толщина стекла недопустима при работе с иммерсионным объективом.

Весьма существенным моментом является подготовка поверхности предметных стекол, что особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу. Для обезжиривания стекол их помещают в сосуд с притертой пробкой в смеси Никифорова (равные объемы спирта и эфира) или спирта. Наиболее надежный способ обезжиривания – обработка стекол хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой и спиртом.

Необработанные стекла можно обезжирить следующим образом: рабочую поверхность стекла натереть мылом, которое затем удалить чистой сухой тканью.

Стекла из обезжиривающих веществ извлекают пинцетом. При работе стекла держат пальцами за ребро.

Покровные стекла, применяемые обычно для приготовления препаратов живых бактерий и наблюдений с сухими системами, также должны быть тщательно вымыты и высушены.

Для определения формы и наблюдения за подвижностью микробов, их размножением, спорообразованием и прорастанием спор пользуются бактериоскопическими препаратами, приготовленными из живых микроорганизмов. Для этой цели можно пользоваться следующими препаратами.

1) *Раздавленная капля.* На чистое предметное стекло наносится небольшая капля водопроводной воды (дистиллированную воду брать не рекомендуется, т. к. в ней отсутствует необходимая для микробов концентрация солей, что может вызвать изменение формы клеток, потерю ими способности к движению и т. д.). В каплю воды вносится иглой небольшое количество исследуемых микробов, тщательно размешивается и покрывается покровным стеклом.

Жидкие культуры (в бульоне) разводить не надо; берется капля зараженного бульона, наносится петлей на предметное стекло и покрывается покровным. Приготовленный препарат рассматривается под микроскопом с сухой системой с самым большим увеличением объектива и окуляра (40×15 или 60×15). Подвижность микробов лучше наблюдать в суточных бульонных культурах, спорообразование же, наоборот, в старых выдержанных культурах и преимущественно на плотных питательных средах.

2) *Висячая капля.* Висячей каплей удобнее пользоваться для наблюдения подвижности микробов, их развития, размножения, образования и прорастания спор и т. д. В висячей капле следует рассматривать суспензию живых микробов в жидкой питательной среде или физиологическом растворе (0,5 %-й раствор NaCl). Суспензия микробов не должна быть густой, т. к. это затрудняет наблюдение изменений, происходящих в отдельных клетках.

Нанося каплю суспензии микробов петлей на покровное стекло, перевертывают его так, чтобы капля висела на нижней стороне стекла, и накладывают его на предметное стекло с углублением по середине. Капля должна свободно висеть в углублении предметного стекла, не касаясь его краев или дна. Края уг-

лубливания предметного стекла предварительно необходимо смазать вазелином для герметичного заключения капли во влажной камере.

Висячую каплю начинают просматривать под малым увеличением $\times 8$. Находят край капли, выступающей в виде темной округлой полосы на матовом фоне препарата. Переводят край капли в центр поля зрения и револьвером заменяют объектив малого увеличения на объектив среднего увеличения ($\times 10$). Макрометрическим винтом устанавливают фокус, поддерживают его микрометрическим винтом и наблюдают за характером движения бактерий в препарате. Устанавливают в микроскопе конденсор темного поля или вставляют между линзами обычного конденсора диск из черной бумаги. Устанавливают конденсор на месте и наносят на его верхнюю линзу каплю дистиллированной воды.

Готовят раздавленную каплю и помещают препарат на столик микроскопа. Налаживают темное поле, просматривают препарат.

Для выявления некоторых морфологических особенностей и количественного учета микроорганизмов, проверки чистоты культуры и ряда других целей готовят фиксированные окрашенные препараты, которые могут храниться длительное время. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы.

1) **Приготовление мазка.** На чистое обезжиренное стекло наносится капля воды, в нее вносится иглой немного исследуемого материала, тщательно перемешивается и размазывается тонким слоем по поверхности стекла. Материал из жидких питательных сред, в т. ч. и из свернувшегося молока, берется петлей и не разводится в капле воды.

2) **Высушивание мазка.** Лучше всего сушить препарат при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание мазка замедленно, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить крайне осторожно, не перегревая мазка, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

3) **Фиксация.** Мазки фиксируют после полного высыхания с целью: а) закрепить микробы на стекле; б) обезвредить культуру; в) облегчить восприятие окраски.

Существует несколько способов фиксации мазка.

1. В пламени горелки (мазки фиксируют следующим образом: стекло берут большим и указательным пальцем или пинцетом и троекратно проводят через верхнюю часть пламени горелки (6 с)).

2. Фиксация в жидкости:

- а) метиловым спиртом – 5 мин;
- б) этиловым спиртом – 10 мин;
- в) смесью Никифорова – 10–15 мин;
- г) ацетоном – 5 мин;
- д) параами кислоты и формалина – несколько секунд.

4) **Окрашивание мазка.** Механизм окраски микробов рассматривают в настоящее время как сложный физико-химический процесс взаимодействия красителя с содержанием бактериальной клетки. Окраска заключается в нанесении на препарат какой-либо одной анилиновой краски. Чаще всего для этих

целей употребляется или фуксин Пфейффера – красная краска, или щелочной раствор метиленовой синьки – голубая краска (синька Леффлера).

Техника окраски: хорошо зафиксированный препарат помещают мазком вверх на стеклянный мостик над ванночкой. На поверхность мазка пипеткой или из капельницы наносят одну из указанных красок. Количество краски должно быть умеренным – она должна покрывать весь мазок, но не стекать за пределы стекла. Фуксин выдерживают на мазке 1–2 мин, синьку – 3–5 мин. Краску с мазка сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой. На высушенный мазок наносят каплю иммерсионного масла, помещают препарат на предметный столик микроскопа и микроскопируют иммерсионным объективом (×90) в проходящем свете. Простой окраской пользуются для обнаружения в чистом материале микробов, определения их количества, формы и расположения.

Контрольные вопросы

1. Как обрабатывать предметные и покровные стекла?
2. Из каких этапов складывается процесс изготовления мазка?
3. Как приготовить мазок из культуры на плотной питательной среде?
4. С какой целью и как высушивают мазки?
5. С какой целью и как фиксируют мазки?
6. Техника простого метода окраски мазков.

Библиографический список

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. Аристовская, Т. В. Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Генкель, П. А. Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
4. Шлегель, Т. Общая микробиология [Текст] / Т. Шлегель. – М. : Просвещение, 2002. – 490 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

2 часа

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА EUBACIERTALES

Цель работы: изучение морфологических особенностей бактерий.

Задача работы: изучить морфологические особенности бактерий.

Обеспечивающие средства: микроскоп, осветитель, бактериологическая петля, пинцет, предметные и покровные стекла, стерильные пипетки на 1–2 мл, кристаллизатор; капельницы с водой, водным фуксином, генцианвиолетом, ме-

тиленовым синим (1:40), иммерсионным маслом и бензином; хлопчатобумажная салфетка, фильтровальная бумага, дезинфицирующий раствор.

Задания

1. Приготовить препараты «раздавленная капля» и фиксированные окрашенные препараты представителей порядка Eubacteriales: кокков (р. *Micrococcus*, р. *Diplococcus*, р. *Streptococcus*, р. *Tetracoccus*, р. *Sarcina* и р. *Staphylococcus*), беспоровых (р. *Bacterium* р. *Corinebacterium*) и спорообразующих (р. *Bacillus*).

2. Окрашенные препараты просмотреть с иммерсионной системой. Отметить форму и сочетание клеток, характер спорообразования, место расположения спор в клетках бацилл. Зарисовать.

Требования к отчету

После просмотра под микроскопом окрашенных препаратов представителей порядков Eubacteriales: кокков (р. *Micrococcus*, р. *Diplococcus*, р. *Streptococcus*, р. *Tetracoccus*, р. *Sarcina* и р. *Staphylococcus*), беспоровых (р. *Bacterium*, р. *Corinebacterium*) и спорообразующих (р. *Bacillus*) описать и предоставить рисунки.

Технология работы

Морфологическая характеристика микроорганизмов включает форму клеток, их сочетание и размеры, подвижность, способность к образованию спор и капсул, а также наличие в клетках некоторых включений. Изучение морфологических особенностей проводят используя методы микроскопии и различные способы окраски клеток. При описании морфологии клеток следует указать возраст культуры, состав среды, условия культивирования. *Бактериальная клетка* – это живой организм с чрезвычайно сложной внутренней организацией, включающей ряд морфологически и биохимически обособленных структур, каждая из которых выполняет определенную функцию. *Бактерии* – одноклеточные организмы, относящиеся к классу Schizomycetes порядку Eubacteriales. Величина бактерии колеблется от десятых долей микрона (1 мк = 0,001 мм) до 10–15 мк в длину и от 0,2 до 1,0 мк в диаметре. Имеются, однако, организмы значительно меньших и бóльших размеров.

Внешние морфологические признаки клеток – форма, величина, взаимное расположение и сочетание клеток – используются при классификации бактерий.

По внешнему виду бактерии подразделяются на три основные группы:

- 1) шаровидные (кокки);
- 2) палочковидные (бактерии, бациллы, клостридии);
- 3) извитые (вибрионы, спириллы и спирохеты).

Кокки – род *Coccus* – имеют, как правило, шаровидную форму с диаметром в 1–2 мк. Реже встречаются кокки бобовидной, ланцетовидной и других форм. Для различных клеток характерно своеобразное расположение клеток, зависящее от направления их деления.

Характер расположения кокков в культуре – основа классификации их на роды. Если кокки делятся только в одной плоскости и дочерние клетки быстро

расходятся, то образуются *моно-* или *микрোকки* (род *Micrococcus*). При делении в одной плоскости дочерние клетки могут оставаться скрепленными попарно – это *диплококки* (род *Diplococcus*) или образовывать цепочки, состоящие из нескольких соединенных клеток, – это *стрептококки* (род *Streptococcus*). При делении в двух взаимно перпендикулярных плоскостях образуются кокки, соединенные по четыре клетки, – это *тетракокки* (род *Tetracoscus*). В случае деления клеток в трех взаимно перпендикулярных направлениях расположение кокков напоминает форму пакетов или тюков, состоящих из 8, 16 и более клеток, – это *сарцины* (род *Sarcina*). Многие кокки делятся беспорядочно, образуя кучки, похожие на гроздья винограда. Это *стафилококки* (род *Staphylococcus*).

Среди представителей этой группы встречаются микроорганизмы, патогенные для человека и животных.

Палочковидные, или цилиндрические, микроорганизмы имеют чаще всего цилиндрическую форму заостренными или закругленными концами. Палочковидные формы, не образующие спор, называются *бактериями* (род *Bacterium*). Некоторые представители палочковидных бактерий имеют разветвленную форму – *коринебактерии* (род *Corynebacterium*).

Величина палочковидных бактерий сильно варьирует. Имеются бактерии, стоящие на грани видимости в оптическом микроскопе (0,1×0,15 мк) и настоящие гиганты в несколько десятков микрон, например некоторые серобактерии. Размеры большинства палочковидных бактерий находятся в пределах 1–5 мк в длину и 0,5–1 мк в диаметре.

В порядке *Actinomycetales* встречаются виды, патогенные для людей, животных и растений, а также виды активно продуцирующих антибиотиков (стрептомицин, тетрацилин и др., витамины группы В и т. д.).

Порядок *Actinomycetales* включает четыре семейства.

Сем. *Mycobacteriaceae*. В это семейство входят микроорганизмы, жизненный цикл которых более сложен, чем истинных бактерий. Многие представители этого семейства могут образовывать мицелий и разветвления. Размножаются микобактерии поперечным делением, почкованием, иногда их клетки распадаются на отдельные кокковидные образования. В чистых культурах, особенно-старых, микобактерии имеют вид искривленных или ветвящихся палочек. Все они аэробы, неподвижны, по Граму красятся положительно, «кислотоустойчивы».

Среди микобактерий известны патогенные виды, вызывающие заболевания у людей и животных (лепру – *Mycobacterium leprae*, туберкулез – *M. tuberculosis*, паратуберкулезный энтерит – *M. paratuberculosis*), и сапрофиты – *M. smegmatis*.

Сем. *Actinomycetaceae* включает формы, образующие истинный мицелий. Размножаются путем сегментации и фрагментации гиф. Спор и конидий не образуют, имеют аэробные и анаэробные виды. Большинство представителей этого семейства – сапрофиты, живущие в почве за счет разложения органических остатков. Среди этого семейства имеются патогенные для людей и животных виды: возбудитель актиномикоза – *Actinomyces bovis*, *Actinomyces albus*.

Сем. *Streptomycetaceae*. Представители этого семейства имеют очень тонкие длинные гифы, образующие скопления, напоминающие мицелий истинных грибов. Размножаются спорами, которые образуются на вершине специальных

воздушных плодовых выростов, называемых конидиефорами. Споры отдельных видов различно устроены; поверхность одних гладкая, а других покрытая волосками. Широко распространены в природе и играют большую роль в разложении различных органических остатков. Имеются представители, активно продуцирующие антибиотики (*Actinomyces streptomycini*, *A. aureofaciens*).

Сем. Actinoplanaceae. Представители этого семейства образуют сильно разветвленный погруженный в субстрат (вегетативный) мицелий и иногда хорошо выраженный воздушный. В анаэробных условиях они образуют спорангиоспоры. У некоторых видов споры имеют полярно расположенный жгутик. Играют большую роль в разложении органических остатков в переувлажненных почвах (*Actinoplanes philippiensis*).

Для изучения морфологии актиномицетов каждый студент готовит препараты «раздавленная капля» нитчатых бактерий и микобактерий, фиксированный окрашенный препарат для представителей микобактерий, препарат «отпечаток» для изучения морфологии актиномицетов. При изучении препаратов обратить внимание на форму, величину, строение, микроструктуру, спорообразование, строение, мицелия микроорганизмов. Зарисовать в альбом.

Контрольные вопросы

1. Что объединяет по морфологии актиномицеты с бактериями и грибами?
2. Способы размножения актиномицетов.
3. Назвать семейства порядка Actinomycetales и дать им краткую характеристику.

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. *Генкель, П. А.* Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
4. Краткий определитель бактерий Берги [Текст] / под ред. Дж. Хоулта. – М. : Мир, 1980. – 496 с.
5. *Шлегель, Т.* Общая микробиология [Текст] / Т. Шлегель. – М. : Просвещение, 2002. – 490 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

2 часа

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ОКРАСКА МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ГРАМУ. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Цель работы: знакомство с техникой окраски мазков по Граму.

Задача работы: изучить методы окраски бактериальных препаратов.

Обеспечивающие средства: микроскоп, осветитель, бактериологическая петля, пинцет, предметные и покровные стекла, кристаллизатор, стерильные пипетки, капельница с водой, генцианвиолетовая краска, раствор Люголя, спирт 96°, фуксин Пфейффера, иммерсионное масло, фильтровальная бумага, марлевая салфетка, культуры: *Bac. megaterium*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* на плотной питательной среде.

Задание

1. Приготовить предметные стекла,
2. Приготовить фиксированный препарат трех культур: (одна грамотрицательная (гр.-), вторая грамположительная (гр.+), третья – исследуемая).
3. Окрасить препарат по Граму.
4. Просмотреть мазки под микроскопом с иммерсионной системой и зарисовать в тетрадь.

Требования к отчету

1. Описать окраску бактериальных препаратов по Граму.
2. После просмотра под микроскопом описать препараты и предоставить рисунки.

Технология работы

Одним из наиболее распространенных методов дифференциальной окраски является окраска по Граму. В зависимости от окраски по Граму, все бактерии делятся на две группы. *Грамположительные* бактерии образуют прочное соединение с фиолетовой окраской; бактерии, не воспринимающие этой окраски, называются *грамотрицательными*.

Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит магниевую соль РНК, образующую прочное соединение с йодом и синей краской (генцианвиолетовым, метилфиолетовым и др.). Этот комплекс не разрушается при воздействии спирта, и бактерии сохраняют первоначальный фиолетовый цвет.

Грамотрицательные бактерии не содержат магниевой соли РНК и поэтому не способны удержать фиолетовую окраску. Под действием спирта они обесцвечиваются и окрашиваются в красный цвет фуксином Пфейффера.

Грамположительные – все виды семейства *Coccaceae* за исключением *Miscosoccus gonorrhoeal*; все споровые формы (*Bac. subtilis*, *Bac. mycoides* и др.); молочнокислые стрептококки и палочки.

Грамотрицательные – *E. coli*, *Bac. aerogenes*, *Bac. proteus*, *Chromobact. prodigiosum*, флюоресцирующие бактерии *Pseudomonas fluorescens*, *Bac. cyanogenes* и др.).

Окраска по Граму.

1. На предметное стекло наносят рядом три мазка микробов: один контроль грамположительный, другой – грамотрицательный, третий – исследуемой культуры.

2. На фиксированный мазок наносят полоску фильтровальной бумаги, пропитанной краской генцианвиолета, и несколько капель воды. Можно нанести раствор генцианвиолетовой краски на 1–2 мин непосредственно на мазок.

3. Снимают пинцетом или сливают краску и, не промывая препарат водой, наносят раствор Люголя на 1 мин до полного почернения.

4. Сливают раствор Люголя, не промывая водой, погружают препарат в стаканчик с 96° спиртом на 20–30 с. Обесцвечивание производят до отхождения фиолетовых струй краски.

5. Смывают спирт водой, наносят раствор фуксина на 1–2 мин.

6. Промывают водой, просматривают под микроскопом с иммерсионной системой и зарисовывают в тетрадь.

Контрольные вопросы:

1. Как обрабатывать предметные и покровные стекла?
2. Из каких этапов складывается процесс изготовления мазка?
3. Как приготовить мазок из культуры на плотной питательной среде?
4. С какой целью и как высушивают мазки?
5. С какой целью и как фиксируют мазки?
6. Техника простого метода окраски мазков.

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. *Генкель, П. А.* Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
4. Краткий определитель бактерий Берги [Текст] / под ред. Дж. Хоулта. – М. : Мир, 1980. – 496 с.
5. *Шлегель, Т.* Общая микробиология [Текст] / Т. Шлегель. – М. : Просвещение, 2002. – 490 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

4 часа

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ

Цель работы: изучение морфологических особенностей грибов.

Задача работы: изучить морфологические особенности низших и высших грибов.

Обеспечивающие средства: микроскоп и осветитель, бактериологическая петля, препаровальные иглы, пинцет, предметные и покровные стекла, стерильные пипетки на 1–2 мл, кристаллизатор; капельницы с водой, метиленовой синькой, водным фуксином, генцианвиолетовым, иммерсионным маслом и бен-

зином; хлопчатобумажная салфетка, фильтровальная бумага, дезинфицирующий раствор, чистые культуры грибов.

Задание

1. Приготовить прижизненный препарат низшего плесневого гриба мукора (*Mucor*) и изучить:

а) строение мицелия (нечленистого);

б) строение органов бесполого размножения: спорангиеносца, спорангия, спорангиеспор; зарисовать и обозначить их на рисунке.

2. Приготовить прижизненный препарат высшего плесневого гриба *Aspergillus* и рассмотреть:

а) строение мицелия (членистого);

б) строение органов бесполого размножения: конидиеносцев, стеригм и конидий; зарисовать и обозначить их.

3. Приготовить препарат плесневого гриба *Penicillium*, рассмотреть его, зарисовать и обозначить в такой же последовательности.

4. Приготовить мазок из культуры дрожжей, окрасить его простым методом, просмотреть под иммерсией и зарисовать.

Требования к отчету

1. Описать строение мицелия низших и высших грибов.

2. Описать вегетативное, бесполое и половое размножение низших и высших грибов.

Технология работы

Плесневые грибы. Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. По интенсивности ферментативной активности и по методике их исследования (рассмотрение подробностей строения под микроскопом, культивирование их на искусственных питательных средах и т. д.) они близки к другим микроорганизмам.

Мицелий плесневых грибов состоит из переплетенных нитей, или *гифов*, способствующих закреплению гриба на субстрате. В отличие от актиномицетов, толщина клеток мицелия плесеней 5–7 мк, нередко 10 мк. Гифы плесеней могут ветвиться. Размножаются плесневые грибы спорами или гифами. Определяют плесени по способности спороношения.

Спороношение лучше всего наблюдать в чашках Петри, рассматривая более тонкие части колоний при малом увеличении микроскопа в проходящем свете. Материал для микроскопического исследования берут осторожно иглой с поверхности колонии и переносят в каплю воды на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом с большим увеличением (лучше пользоваться молодой культурой). Естественное расположение спор в большинстве случаев при этом нарушается, но обыкновенно удается найти в препарате места, где можно рассмотреть строение конидиеносцев, форму конидий. Размножаются грибы вегетативным, бесполом и половым путями.

Вегетативное размножение осуществляется частями мицелия, образованием оидий, хламидоспор, бластоспор и почкованием.

Бесполое размножение у низших грибов происходит при помощи спор, образующихся внутри специальных плодовых тел, называемых *спорангиями*. Гифы мицелия, на которых расположены спорангии с эндоспорами, называются *спорангиеносцами*. Большая часть плесеней дает несовершенные формы спороношения – конидиальные споры. Конидии отчленяются от стигм, расположенных на концах плодоносящих гиф, называемых *конидиеносцами*.

Представителем плесеней с простейшим типом спорообразований является *Oidium lactis* – молочная плесень, появляющаяся в виде бархатистого пушка обычно на поверхности таких молочных продуктов, как сметана, простокваша. Колонии имеют белый, слегка приподнимающийся мицелий.

У гриба *Mucor* очень пушистый, ветвистый одноклеточный мицелий, который обычно заполняет чашку Петри, переползая даже на крышку. При рассмотрении с большим увеличением мицелий представляется как одна гигантская ветвистая клетка, но с большим количеством ядер. Еще более характерно спороношение мукора: приподнимающиеся спорангиеносцы заканчиваются наверху шаровидными образованиями – *спорангиями*, наполненными эндоспорами.

Плесени *Aspergillus* и *Penicillium* имеют ветвящийся многоточечный мицелий. У *Aspergillus* на приподнимающихся конидиеносцах образуются бесцветные вздутия, на которых вырастают стеригмы, на концах стеригм развиваются цепочками споры – *конидии*. У плесеней *Penicillium* конец неутолщенной веточки мицелия вилкообразно ветвится, на концах первичных или вторичных веточек образуются конидии. Все спороношение вследствие параллельного положения веточек имеет форму кисточек, а отсюда и название – «кистевик».

Дрожжи. Дрожжевые клетки морфологически довольно разнообразны. Они бывают округлыми, овальными, удлинёнными или лимоновидными. Клетки дрожжей значительно крупнее бактериальных. Диаметр округлых форм колеблется в среднем от 4 до 12 мк. Оболочка дрожжевых клеток, в отличие от бактериальной, легко различима в обычном световом микроскопе. Особенно четко видна оболочка при исследовании дрожжей с помощью фазово-контрастного устройства. В цитоплазме хорошо видны вакуоли. При специальной окраске в цитоплазме обнаруживаются дифференцированное ядро, митохондрии, гликоген, крахмал, капельки жира, волутин, основным компонентом которого являются полифосфаты. Клетки дрожжей грамположительны. На плотных питательных средах дрожжи растут в виде различных выпуклых, округлых или лопастных, гладких или складчатых, бесцветных, желтовато-оранжевых или ярко-розовых колоний мягкой консистенции. Форма и цвет колоний имеют значение для диагностики дрожжей. Размножение дрожжей осуществляется почкованием и делением.

Кроме того, у многих делящихся и почкующихся дрожжей наблюдается половой процесс, связанный со спорообразованием. Дрожжи, способные к половому процессу, называются *истинными дрожжами* и относятся к классу сумчатых грибов (аскомицеты). В каждой клетке – сумке – образуются от двух до восьми, иногда до 12 спор.

Среди дрожжей есть виды, осуществляющие спиртовое брожение, виды, вызывающие заболевания растений, животных и человека.

Морфологию грибов лучше изучать в прижизненных препаратах в раздавленной капле или микрокамере. Изготавливают препарат следующим способом. На середину чистого предметного стекла наносят каплю дистиллированной воды или физиологического раствора. Стерильной бактериологической петлей или иглой снимают воздушный мицелий гриба с поверхности питательной среды, переносят захваченный мицелий на предметное стекло в каплю воды. Мицелий разрывают на отдельные куски, препарат накрывают покровным стеклом, помещают на столик микроскопа и просматривают сначала при малом, а затем при среднем увеличении микроскопа при опущенном конденсоре. Для лучшей видимости строения мицелия в каплю под предметное стекло можно добавить небольшое количество краски (одну каплю фуксина).

Для изучения морфологии дрожжей каждый студент готовит мазок из культуры хлебных дрожжей, выращенных в 10 %-м растворе сахара. Мазки фиксируют над пламенем, окрашивают фуксином или метиленовой синькой и просматривают под иммерсией. При изучении мазков обращают внимание на форму дрожжевых клеток, наличие в их протоплазме включений, отыскивают делящиеся клетки с почками.

Контрольные вопросы

1. Назвать особенности морфологии грибов и их отличие от бактерий и актиномицетов.
2. Способы размножения грибов и дрожжей.
3. Назвать основные классы грибов и дрожжей.

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. *Генкель, П. А.* Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
4. Краткий определитель бактерий Берги [Текст] / под ред. Дж. Хоулта. – М. : Мир, 1980. – 496 с.
5. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.
6. *Литвинов, М. А.* Определитель микроскопических почвенных грибов [Текст] / М. А. Литвинов. – Л. : Наука, 1967. – 303 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

4 часа

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: ознакомление с культивированием микроорганизмов.

Задача работы: изучить правила приготовления питательных сред для культивирования различных физиологических групп микроорганизмов.

Обеспечивающие средства: микроскоп с осветителем, бактериологическая петля, пипетки, шпатели стеклянные, предметные и покровные стекла, спички, спиртовка, МПА, пробирки с ватными пробками, стерильная вода, универсальный рН-индикатор, капельница с бромтимолблау, 10 %-м раствором кислот, щелочей, водяная баня, штатив для пробирок, дезинфицирующий раствор, карандаш по стеклу, колбы на 250 мл, чашки Петри, бумага, культура дрожжей, смесь культур.

Задание

1. Приготовить мясо-пептонный агар (МПА), разлить его в пробирки для скошенного агара в колбы для чашек Петри. Отдать на стерилизацию при давлении 1,5 атм.

2. Посеять культуру дрожжей в пробирки с жидким сусликом и поместить пробирки в термостат при 30,5 °С.

3. Провести посев микробов на твердые питательные среды: смесь культур; *Sarcina aurantica*, *Bac. mycoides*, *Proteus vulgaris*:

а) на чашки Петри методом Дригальского (смесь культур);

б) на скошенный агар (чистую культуру).

4. Приготовить синтетическую среду Чапека. Произвести засев культуры гриба в приготовленную среду Чапека, поставить в термостат.

Требования к отчету:

Законспектировать правила приготовления питательных сред и методы культивирования различных физиологических групп микроорганизмов.

Технология работы

Основным приемом при культивировании микроорганизмов и выделении чистых культур является посев. Посев и пересев микробов на питательные среды – самый распространенный прием в бактериологической технике.

Посев на питательные среды производится в целях:

а) выделения чистой культуры микробов;

б) сохранения жизнедеятельности чистой культуры;

в) поддержания определенного возраста культуры, что необходимо при исследованиях морфологических и биологических свойств микробов;

г) идентификации микробов.

Материалами для исследования могут быть: образцы почвы, семена, подземные части или корни растений, вода, различные выделения микроорганизмов, человека и животных и т. д. Доставленный в лабораторию материал подвергают бактериологическому исследованию в тот же день.

Состав питательных сред:

МПА – мясо-пептонный агар – богатая питательными веществами среда, на которой развиваются многие гетеротрофные микроорганизмы, использующие органический азот. Его готовят следующим образом: 500 г мяса нарезают на мелкие кусочки или пропускают через мясорубку, заливают водопроводной водой (1 л) и оставляют при комнатной температуре на 12 ч или в термостате при

30 °С на 6 ч, а при 37° – на 2 ч. За это время из мяса экстрагируются различные вещества, в т. ч. водорастворимые витамины. Затем мясо отжимают через марлю, полученный мясной настой кипятят 30 мин. После того как настой остынет, его фильтруют через вату, доливают водой до первоначального объема и к полученной мясной воде добавляют 0,5 % NaCl и 1 % пептона. Таким образом, МПА – богатая питательная среда, но она почти не содержит углеводов.

КАА – крахмало-аммиачный агар (г) – среда, на которой развиваются микроорганизмы, использующие минеральный азот. Состав: растворимый крахмал – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; агар – 20 г; вода дистиллированная – 1000 мл.

Среда Чапека – среда, в которой хорошо развиваются сахаролитические микроорганизмы. Ее состав: сахароза – 30,0; NaNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; агар – 20,0; вода дистиллированная – 1000 мл.

Среда Эшби – среда для выявления азотфиксирующих микроорганизмов. Состав: маннит или сахароза – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; CaCO_3 – 5,0; агар – 20 г; вода дистиллированная – 1000 мл.

Среда Гетчинсона – для выявления целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Состав: K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; NaNO_3 – 2,5; агар – 20 г; вода дистиллированная – 1000 мл.

Среда Виноградского – для выявления всех групп микроорганизмов. Состав: KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; MnSO_4 – 0,01; KNO_3 – 4,0; CaCO_3 – 5,0; агар – 20 г; вода дистиллированная – 1000 мл.

Питательную среду, расплавленную на водяной бане, соблюдая стерильность, разливают в чашки Петри слоем 0,5–0,8 см. На крышке чашки Петри указывают номер пробы, дату посева, разведение и повторность.

Для выделения микроорганизмов проводят поверхностный посев суспензии на питательную среду. На каждое новое разведение суспензии берут новую стерильную пипетку и новый стерильный шпатель.

Посев на плотные питательные среды. При посеве на косою агар пробирку с культурой и скошенным агаром берут в левую руку так, чтобы скошенная поверхность агара была обращена кверху. Пробки пробирок захватывают мизинцем правой руки и открывают над пламенем. Прокаленной петлей захватывают материал над пламенем и при строгом соблюдении стерильности переносят в пробирку со свежей питательной средой. Петлю с культурой опускают на дно пробирки. Прикасаются петлей к питательной среде и скользящими движениями по скошенной поверхности агара наносят прямую линию или зигзагообразные штрихи.

Распределив материал, петлю вынимают. Край пробирки обжигают на пламени. Пробирки над пламенем закрывают пробками, затем подписывают и ставят в штатив. Петлю для уничтожения имеющихся на ней микроорганизмов прокалывают в пламени горелки и тоже ставят в штатив.

При посеве чашки Петри устанавливают около горелки и фиксируют на столе левой рукой. Крышку приподнимают большим, средним, указательным пальцами настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходила петля

или шпатель. Посевной материал захватывают петлей и штриховыми движениями распределяют по поверхности питательной среды. Можно нанести каплю посевного материала на поверхность агара петлей или пипеткой, а затем распределить ее стерильным шпателем. Стерильные пипетки и стеклянные шпатели перед посевом разворачивают из бумаги над пламенем горелки, а после посева опускают в дезинфицирующий раствор. На чашках Петри со стороны дна, а на пробирках в верхней части делают надпись восковым карандашом или тушью, где указывают дату, название культуры и т. д. Пробирки и чашки Петри с посевным материалом помещают в термостат, чашки размещают вверх дном, что предотвращает отекание конденсационной воды с крышки и размыв колоний.

Посев уколом в столбик питательной среды. Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку, над пламенем вынимают пробку и переворачивают пробирку вверх дном. Петлю с исследуемым материалом вкалывают снизу в центр столбика на всю ее глубину, затем петлю извлекают, пробирку закрывают, подписывают и помещают в термостат для вымачивания.

Каждый студент производит посев исследуемого материала в пробирку с жидкой питательной средой. Посев производят либо пипеткой, либо бактериологической петлей. При посеве следят за правильностью держания пробирок, стерильностью производимой работы и техникой посева.

Контрольные вопросы

1. Для какой цели производят посев и пересев микробных тел?
2. Как производится посев на плотные питательные среды?
3. Как произвести посев на жидкие питательные среды?

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. *Генкель, П. А.* Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
4. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

4 часа

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ СЧЕТНЫХ КАМЕР

Цель работы: знакомство с техникой количественного учета микроорганизмов с помощью счетных камер и измерения величины микробных клеток с помощью окуляр-микрометра.

Задача работы: изучить методы количественного учета микроорганизмов с помощью счетных камер и измерения величины микробных клеток с помощью окуляр-микрометра.

Обеспечивающие средства: микроскоп и осветитель, объектив-микрометр, окуляр-микрометр, камера Горяева, бактериологическая петля, стерильные пипетки на 1–2 мл, капельница с водой, хлопчатобумажная салфетка, фильтровальная бумага, дезинфицирующий раствор, чистые культуры грибов.

Задания

1. Провести количественный учет клеток дрожжей, содержащихся в предоставленной суспензии (подсчет клеток дрожжей в исходной (неразбавленной) суспензии и суспензии, разбавленной в 2,5 и 10 раз в трехкратной повторности; подсчет клеток дрожжей в счетной камере Горяева при объективе $\times 20$ или $\times 40$).

2. Определить: 1) цену деления окуляр-микрометра с помощью объектив-микрометра; 2) величину, размеры дрожжей.

Требования к отчету

1. Описать методы количественного учета микроорганизмов с помощью счетных камер и измерения величины микробных клеток с помощью окуляр-микрометра.

2. Заполнить таблицы по подсчету количества клеток дрожжей в исходной суспензии.

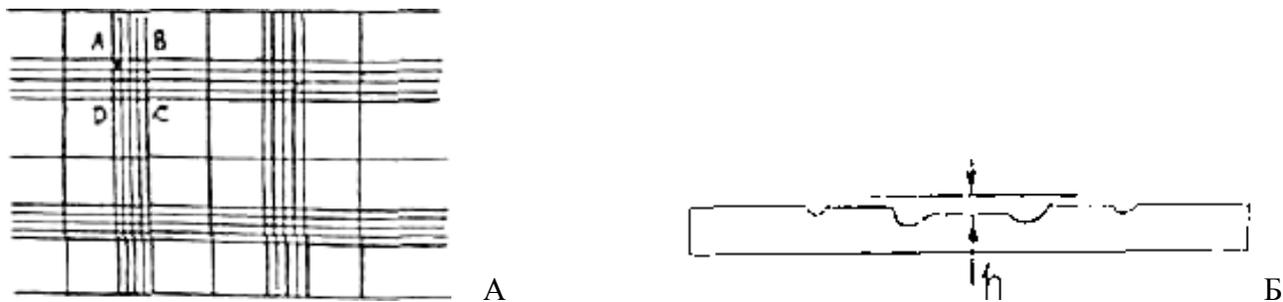
Технология работы

Метод прямого подсчета клеток микроорганизмов в счетных камерах успешно применяют для определения общего количества микроорганизмов, содержащихся во взвесах (суспензиях).

Метод количественного учета микроорганизмов с помощью счетных камер имеет ограниченное применение, связанное с тем, что в счетных камерах проводится учет всех клеток микроорганизмов без их дифференциации на живые и мертвые клетки. Кроме того, счетные камеры могут быть использованы лишь для подсчета относительно крупных объектов – клеток водорослей, дрожжей, спор грибов, микроскопируемых при объективе $\times 8$ –40.

Счетная камера представляет собой толстое предметное стекло с нанесенными на нем поперечными прорезами, которые образуют три поперечно расположенные плоские площадки (см. рисунок). Средняя площадка продольным прорезом разделена пополам, причем на каждой половине нанесена квадратная сетка. Две боковые площадки расположены на 0,1 мм выше средней. Эти площадки служат для притирания покровного стекла.

Сетка разделена на определенное число больших и маленьких квадратов, по разному сгруппированных. Постоянной величиной во всех сетках является маленький квадрат (ABCD, сторона которого равна $1/20$ мм, площадь – $1/400$ мм², а объем при высоте камеры $1/10$ мм – $1/4000$ мм³, или $1/4000000$ мл. Так называемый большой квадрат ABCD состоит из 16 малых квадратиков.



Счетная камера Горяева: А – вид сверху; Б – вид сбоку, h – высота камеры

Камера Горяева имеет площадь 9 мм^2 и разбита на 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом ряду). Каплю взвеси наносят на сетку камеры и сверху накрывают чистым покровным стеклом. Жидкость под покровным стеклом должна равномерно без пузырьков распределиться по всей сетке, не выступая в желобок между стенками. Большими пальцами покровное стекло плотно притирают к боковым площадкам камеры до появления ньютоновских колец. Камеру с исследуемым материалом помещают на предметный столик микроскопа и микроскопируют с объективом $\times 10\text{--}40$ (в поле зрения должны быть отчетливо видны как квадратики, так и клетки микроорганизмов).

Просчитывают количество клеток в пяти больших квадратах (т. е. в 80 малых), расположенных по диагонали. Учитывают все клетки, размещенные внутри квадрата и на пограничных линиях, если они большей частью лежат внутри квадрата. Клетки, разделенные пограничной линией пополам, считают только на двух из четырех границ квадрата, а клетки, лежащие большей своей половиной вне данного квадрата, совсем не учитывают.

Находят среднее количество клеток в одном квадратике. Допустим, в пяти больших квадратах (80 малых) – 240 клеток, тогда в одном малом квадратике среднее количество клеток – $240 : 80 = 3$. Пересчет на 1 мл суспензии с учетом разведения производят по формуле

$$N = a \cdot 1000K/h \cdot S,$$

где N – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число клеток в малом квадрате; h – глубина камеры, мм; S – площадь малого квадрата, мм; K – разведение исходной суспензии; 1000 – коэффициент пересчета мм^3 в мл ($1 \text{ мл} = 1000 \text{ мм}^3$).

Результаты работы оформляют в виде следующей таблицы.

Количественный учет микроорганизмов в камере Горяева

Разведение	Повторность	Количество клеток микроорганизмов в большом квадрате счетной камеры					Общее число клеток в малых квадратах	Среднее число клеток	Количество клеток в исходном образце
		1	2	3					
0	1								
	2								
	3 и др.								
1	1								
	2								
	3 и др.								

Определение размеров клеток проводят под микроскопом с помощью окулярной линейки (микрометра) или окулярного винтового микрометра, используя чаще всего 24-часовые культуры микроорганизмов. Размеры клеток особенно удобно определять, пользуясь фазово-контрастным устройством.

Окулярный микрометр представляет собой круглую стеклянную пластинку, в центре которой выгравирована линейка длиной 5 мм. Линейка разделена на 50 частей. Окулярный микрометр вставляют в окуляр. Однако делениями окуляр-микрометра нельзя непосредственно измерять величину клетки, т. к. последние рассматриваются через объектив и окуляр, а деления линейки – только через верхнюю линзу окуляра. Поэтому, прежде чем приступить к измерению величины клеток, необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного микроскопа. Определение цены деления проводят с помощью объективного микрометра.

Объективный микрометр – пластинка с отверстием в центре. В отверстие вставлено стекло, на котором нанесена линейка длиной в 1 мм. Эта линейка разделена на 100 частей, так что одно деление объективного микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мк. Для определения цены деления окулярного микрометра объектив-микрометр помещают на столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого меняют объектив на тот, при котором будут определять размер клеток. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую. Определение цены деления окулярного микрометра проводят по принципу нониуса, т. е. совмещают одну из черточек шкалы окулярного и объективного микрометров и находят следующие совмещения. Устанавливают, скольким делениям объективного микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра. Например, два деления объект-микрометра (20 мк) соответствуют пяти делениям окуляр-микрометра, следовательно, одно деление окуляр-микрометра равняется 4 мк (20:5). Если теперь на столик микроскопа положить препарат с клетками микроорганизмов и рассмотреть его при этом же увеличении, то можно измерить величину клетки. Для этого определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует величина измеряемого объекта, и умножают это число на цену деления окулярного микрометра. Очень удобно измерять размеры клеток с помощью винтового микрометра МОВ-1-15-х, правила работы с которым подробно изложены в инструкции, прилагаемой к прибору.

Контрольные вопросы

1. Какие счетные камеры вам известны?
2. Что из себя представляет счетная камера Горяева?
3. Из каких этапов складывается процесс изготовления исследуемого препарата для проведения количественного учета с помощью счетных камер?
4. Каковы размеры бактериальных клеток?
5. Способы измерения микроорганизмов.
6. Как определить цену окуляр-микрометра?

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

4 часа

АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ БАКТЕРИЙ В ВОДЕ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА И ИНДЕКСА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ В ВОДЕ

Цель работы: изучение методов анализа микрофлоры воздуха и воды.

Задача работ: изучить основные методы анализа микрофлоры воздуха и воды.

Обеспечивающие средства: микроскоп и осветитель, набор красителей, спиртовка, капельница с иммерсией, пробирки со стерильной питательной средой (МПА), стерильные чашки Петри с питательными средами МПА, стерильные пипетки на 1 мл, пробирки с 9 мл стерильной воды, водяная баня, электроплитка, термометр, вода водопроводная (в колбочке или пробирке), вода из открытого водоема, спиртовка, спички, стерильные стеклянные шпатели или изогнутые стеклянные палочки, микробиологические петли, предметные и покровные стекла, восковые карандаши, красители, чистые этикетки.

Задание

1. Определить бактериальную загрязненность воздуха учебной комнаты методом седиментации (по Коху).
2. Приготовить мазки из выросших колоний, окрасить, исследовать под микроскопом, микроскопическую картину зарисовать в альбом.
3. Определить количество микроорганизмов в речной и водопроводной воде.

Требования к отчету: описать методы микробиологического анализа воздуха; микробиологические методы изучения состава микроорганизмов воды.

Технология работы

Микрофлора воздуха, бактериальное загрязнение закрытых помещений. Воздух является средой, неблагоприятной для развития микроорганизмов. Источником микрофлоры воздуха является почва, растительность, животные и люди. Наиболее загрязнены микробами приземные слои атмосферы. Наибольшее количество

во микробов содержится в воздухе над городами. При удалении от земли воздух содержит меньше микробов. Так, над Москвой на высоте 500 м в каждом кубическом метре воздуха содержится 2000–3000 микробов, на высоте 1000–1500, а на высоте 2000 м только 500 микробов. Однако даже в очень высоких слоях атмосферы (2000–3000 м) встречаются споры бацилл и плесневых грибов.

Бактериальная зараженность закрытых помещений (жилых комнат, производственных и общественных помещений) всегда большая. Большинство микробов, содержащихся в воздухе, относятся к сапрофитам. Однако в нем могут находиться и патогенные для людей, животных и растений виды.

Для обнаружения микробов в воздухе предложено большое количество методов и приборов, позволяющих определить как общее количество, так и видовой состав микрофлоры. Определение количественного состава микрофлоры и ее качественного состава в воздухе проводится методами, в основу которых положены два принципа: оседания (седиментация) и засасывание (аспирация).

Метод оседания (по Коху) самый простейший метод. Он основан на оседании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Для определения микроорганизмов в воздухе по методу Коха на определенной высоте от поверхности пола каждый студент устанавливает чашку Петри с МПА. Чашки открывают полностью и выдерживают в течение 5 мин. Затем чашки закрывают, переносят в термостат с температурой 37 °С на 24 ч и оставляют на 48 ч при комнатной температуре. Через трое суток производят подсчет выросших колоний бактерий и грибов. По количеству колоний, выросших в чашках Петри, определяют бактериальную загрязненность воздуха.

Установлено, что за 5 мин при спокойном состоянии воздуха на площадь 100 см² оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количество выросших колоний микробов на ней, определяют количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха. Например, в чашке Петри диаметром 10 см выросло 25 колоний бактерий. Тогда площадь питательной среды равна $S = 3,14 \times 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$. Если на площадь 78,5 см² за 5 мин осело 25 микробов, то за это время на площади 100 см² осело бы микробов:

$$\begin{array}{l|l} 78,5 - 25 & \\ 100 - x & \end{array} \quad \left| \quad x = 25 \cdot 100 : 78,5 = 32. \right.$$

Таким образом за 5 мин на площадь 100 см² осело бы 32 микробные клетки из 10 л воздуха. Чтобы узнать количество бактерий, содержащихся в 1 м³ воздуха, составим следующую пропорцию:

$$\begin{array}{l|l} 10 \text{ л} - 32 & \\ 1000 \text{ л} - x & \end{array} \quad \left| \quad x = 32 \cdot 100 : 10 = 3200. \right.$$

Следовательно, в 1 м³ воздуха содержится 3200 бактерий.

Степень загрязненности водоемов органическими веществами и наличие в них микроорганизмов соответствуют определенным зонам сапробности. Различают три зоны сапробности.

1. *Олигосапробная зона* содержит небольшое количество органических веществ и мало бактерий — от 10 до 1000 в 1 мл.

2. *Мезосапробная зона* – зона более загрязненной воды, где происходит распад белков и углеводов. Количество бактерий в 1 мл этой воды достигает 100 000.

3. *Полисапробная зона* – зона сильнейшего загрязнения, где резко выражены гнилостные процессы анаэробного типа. Число бактерий в ней доходит до 1 000 000 в 1 мл.

Количественный учет бактерий в воде дает возможность определить ее чистоту.

Материалы и оборудование: микроскоп, пробирки со стерильной питательной средой (мясо-пептонным или бобово-пептонным агаром), стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 мл, пробирки с 9 мл стерильной воды, водяная баня, электроплитка, термометр, вода водопроводная (в колбочке или пробирке), вода из открытого водоема, спиртовка, спички, стерильные стеклянные шпатели или изогнутые стеклянные палочки, микробиологические петли, предметные и покровные стекла, восковые карандаши, красители.

Ход работы. В качестве твердой питательной среды используют стерильный мясо-пептонный агар или бобово-пептонный в количестве 2/3 пробирки.

Для исследования в стерильные колбочки или пробирки берут водопроводную воду и воду из открытого водоема в объеме 5–10 мл. Колбочки или пробирки должны быть закрыты стерильными ватными пробками. Пробы хранят при температуре не выше +4 °С и не более 3 ч. Для количественного учета необходимо исследуемую воду (загрязненную) развести (разбавить).

Разведение производят следующим образом. Готовят ряд пробирок с 9 мл стерильной воды в каждой из них (в пробирку наливают 10 мл воды, после стерилизации в автоклаве ее в пробирке остается 9 мл). Пробирки нумеруют. Стерильной пипеткой берут 1 мл исследуемой воды и вносят в пробирку № 1 с 9 мл стерильной воды, обжигая при этом пробку и горлышко пробирки на пламени спиртовки (разведение будет 1:10). Затем после перемешивания воды путем продувания воздуха через ту же опущенную пипетку свежей стерильной пипеткой берут 1 мл из пробирки № 1 и вносят в пробирку № 2 (разведение будет 1:100). После перемешивания воды в пробирке № 2 новой стерильной пипеткой берут из нее 1 мл и вносят в пробирку № 3 (разведение будет 1:1000) и т. д.

Воду из водопровода и артезианских колодцев можно использовать без разведения (1 мл). Воду открытых водоемов следует разводить не менее чем 1:1000.

Из пробирки последнего разведения после перемешивания воды производят посев микроорганизмов.

1. В стерильную чашку Петри выливают расплавленную на водяной бане питательную среду (МПА) в количестве 10 мл (2/3 пробирки), чашку закрыва-

ют и дают застыть пластинке. Затем из пробирки последнего разведения стерильной пипеткой берут 0,2 мл воды, приподнимают крышку чашки, выливают на поверхность пластинки воду из пипетки и разравнивают ее по поверхности, используя стерильный стеклянный шпатель или изогнутую стеклянную палочку. Чашку закрывают и этикетируют. Следует дать воде впитаться в пластинку, после чего чашку помещают в термостат при температуре 22–25 °С, положив ее вверх дном, чтобы избежать конденсации паров воды на крышке.

2. 1 мл воды из пробирки последнего разведения выливают на дно стерильной чашки Петри и сверху заливают расплавленной питательной средой, температура которой не должна превышать 45 °С. Чашку закрывают и осторожным покачиванием размешивают воду с питательной средой и равномерно размещают по дну.

3. Из пробирки последнего разведения берут 1 мл воды и вносят в пробирку со стерильной расплавленной средой (температура ее не должна быть выше 45 °С). Закрыв пробирку проведенной через пламя спиртовки пробкой, быстро перемешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями, и выливают все содержимое пробирки в стерильную чашку Петри. Чашку закрывают и, осторожно наклоняя ее, разравнивают питательную среду по всей поверхности дна. Дают застыть пластинке, чашку этикетируют и помещают в термостат. Последний способ обеспечивает наилучшее размешивание исследуемой воды с питательной средой. Повторность посева должна быть не менее трехкратной.

Через несколько (3–5) суток производят подсчет развившихся в чашках Петри колоний и определяют количество бактерий в 1 мл воды (среднее количество колоний умножают на разведение).

Данные исследования можно оформить в виде таблицы.

Источник воды	Количество микроорганизмов в 1 мл исследованной воды

Метод мембранных фильтров для определения содержания кишечной палочки в воде. Этот метод используется для анализа водопроводной воды. Фильтр помещают в горячую воду, кипятят 3 раза по 15 мин, сменяя каждый раз воду, затем ставят в простерилизованный аппарат Зейтца и фильтруют исследуемую воду при помощи водоструйного насоса. Количество фильтруемой воды – от 500 до 300 мл в зависимости от чистоты. После фильтрования фильтр переносят стерильным пинцетом на чашку Петри со средой Эндо. Чашку помещают на сутки в термостат с температурой 43 °С, спустя сутки смотрят выросшие колонии. Кишечная палочка дает на среде Эндо характерные колонии с металлическим блеском, вокруг которых среда краснеет вследствие образования кислоты. Из нескольких колоний делают мазки и красят по Грамму. Кишечная палочка грамотрицательна.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы определения бактериального загрязнения воздуха?

2. Как производится подсчет количества микробных тел в 1 м³?
3. По каким параметрам воду относят к разным зонам сапробности?
4. Методы отбора проб воды.
5. Как проводят микробиологический анализ воды?
6. Как производится подсчет количества микробных тел в 1 мл воды?
7. На чем основан бактериологический анализ воды?
8. Что такое коли-титр и коли-индекс?

Библиографический список

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

4 часа

ЗНАКОМСТВО С МИКРООРГАНИЗМАМИ ПОЧВЫ

Цель работы: знакомство с микроорганизмами почвы.

Задача работы: изучить правила отбора почвенных проб из различных типов почв; методы микробиологического анализа почвенных проб.

Обеспечивающие средства: стерильные колбы, чашки Петри, пробирки со стерильной водой, питательные среды МПА, Чапека, КАА, почвенный агар, среду Эшби, СА, резиновые перчатки, спиртовка, стерильные пипетки на 10, 2, 1 мл, стеклянные шпатели, водяная баня, этикетки.

Задание

1. Теоретическое ознакомление правилами подготовки инструментов, почвенных мешочков и бумажных пакетов для отбора почвенных проб, отбора почвенной пробы.
2. Проведение микробиологического анализа.

Требования к отчету: описать правила подготовки инструментов, почвенных мешочков и бумажных пакетов для отбора почвенных проб, отбора почвенной пробы; проведение микробиологического анализа почвы.

Технология работы

Отбор почвенной пробы и подготовка образца к анализу. Микроорганизмы играют важную роль в процессе формирования почвы. Численность микроорганизмов в почве во многом определяет ее плодородие. Изучение микроорганизмов почвы дает надежные результаты лишь в том случае, если правильно взяты почвенные образцы. До взятия почвенных образцов следует сделать описание района исследования, указав характер рельефа, растительность и агротехнику. Необходимо дать подробную характеристику почв.

При исследовании микроорганизмов в почвенных горизонтах делают почвенный разрез. Вертикальную стенку почвенного разреза зачищают каждый раз перед взятием образцов почвы. При изучении микрофлоры участка определенной площади готовят смешанные образцы почвы, отбирая пробы по диагонали участка на определенной глубине от поверхности. Микроорганизмы в почве распространены неравномерно, поэтому важно анализировать большое число почвенных образцов. По Н. А. Красильникову, рекомендуется на участке площадью 100 м² анализировать три образца почвы, каждый из которых состоит из трех проб.

Почвенные образцы берут в стерильные пергаментные пакеты или стеклянные банки, закрытые ватно-марлевыми пробками. Для отбора почвенных образцов удобно использовать металлические совки, садовые ножи или небольшие лопаты, иногда почвенный бур. Оборудование протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и обжигают на пламени. Для количественного учета почвенных микроорганизмов и качественного анализа допустимо совки и ножи обтирать многократным втыканием их в исследуемый почвенный горизонт. Каждый образец почвы сопровождают этикеткой, где указывают дату взятия образца, район участка и горизонт. Для взятия пробы почвы стерильным ножом снимают верхний слой почвы 1,5–2 см, который может быть загрязнен посторонней микрофлорой. Далее совком или лопатой берут 100–200 г почвы и насыпают в пакет или банку. При изучении микроорганизмов пахотных почв образцы берут на всю глубину пахотного слоя. При изучении микроорганизмов на разной глубине пробы почвы берут по генетическим горизонтам из почвенного разреза. В горизонте делают нишу и из нее извлекают почвенную пробу, начиная с нижнего горизонта к верхнему.

Почвенные образцы желательно анализировать в тот же день, т. к. количество микроорганизмов в них может измениться. Или же оставить в холодильнике. Для диспергирования почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц почву подвергают обработке ультразвуком (установка УЗДН-1), растиранию или встряхиванию на пропеллерной мешалке. Такая предварительная обработка почвы позволяет учесть значительно большее количество микроорганизмов. Наиболее доступным приемом предварительной обработки почвы, дающим хорошие результаты, следует считать растирание почвенного образца.

Исследуемую почву высыпают на стерильное стекло. (Стекло заранее протирают спиртом и обжигают на пламени.) Почву тщательно перемешивают шпателем, удаляя механические частицы и корни растений. Соблюдая стерильность, на часовом стекле отвешивают 10 г почвы и переносят ее в стерильную ступку.

Навеску почвы в ступке увлажняют до пастообразного состояния, добавляя 2–3 мл воды из первой колбы, содержащей 90 мл стерильной воды, и растирают 5 мин пальцем в резиновой перчатке. После растирания почву из ступки переносят с помощью воды во вторую сухую колбу, получают первое разведение 1:10.

Почвенную суспензию в колбе встряхивают в течение 5 мин, дают отстояться 30 с и далее стерильной пипеткой переносят 1 мл почвенной суспензии из колбы в пробирку № 1 с 9 мл стерильной дистиллированной воды, получают второе разведение – 1:100. Подобным образом готовят ряд последующих разведений почвенной суспензии – 1:1000, 1:10000, 1:100000 1:1000000 и более, в за-

висимости от предполагаемой численности микроорганизмов, учитывая тип почвы, генетический горизонт, сезон года, влажность почвенной пробы и т. д. Для приготовления каждого нового разведения почвенной суспензии следует пользоваться новой стерильной пипеткой.

Посев. Для выделения и количественного учета бактерий почвенную суспензию высевают на одну из питательных сред пластинки МПА, КАА, почвенный агар, среду Эшби; для учета актиномицетов используют КАА или среду Чапека; для выделения и количественного учета грибов и дрожжей применяют СА или модифицированную среду Чапека.

Питательную среду, расплавленную на водяной бане, соблюдая стерильность, разливают в чашки Петри слоем 0,5–0,8 см. Для посева на каждое разведение почвенной суспензии готовят по 3–5 чашек Петри. После застывания среды для удаления капель воды с крышек чашки Петри подсушивают в термостате при температуре 60–70 °С. На крышке чашки Петри пишут этикетку, указывая номер почвенной пробы, дату посева, разведение и повторность.

Стерильной пипеткой на 1 мл наносят каплю почвенной суспензии из соответствующего разведения по центру питательной среды в чашке Петри и тщательно растирают ее стеклянным шпателем по всей поверхности агаровой пластинки. Для посева почвенной суспензии удобно пользоваться микропипетками на 0,1–0,2 мл. Засеянные чашки Петри переворачивают средой вверх и помещают в термостат при температуре 28–30 °С.

Подсчет колоний бактерий на чашках Петри проводят через 3–5 сут., грибов и дрожжей – через 5–7, актиномицетов через 7–15. Наиболее точный результат получается при развитии на чашке Петри 50–200 колоний бактерий и актиномицетов и 30–50 колоний грибов. Следует иметь в виду, что при очень большом и очень малом количестве колоний на чашках Петри могут быть значительные ошибки при подсчете микроорганизмов. Обычно почвенную суспензию высевают из 3–4 последовательных разведений на 3–5 чашек Петри из каждого разведения. Для учета грибов почвенную суспензию высевают из разведений на один-два порядка ниже, чем для учета бактерий и актиномицетов.

Подсчет колоний микроорганизмов на чашках Петри. Для удобства подсчета колоний микроорганизмов дно чашки Петри разделяют тушью или чернильной пастой на секторы или сегменты. Если питательная среда прозрачна, подсчет колоний ведут в проходящем свете со дна чашки; в случае непрозрачной питательной среды колонии микроорганизмов подсчитывают непосредственно с поверхности агара. Ученные колонии отмечают точками на стекле. Подсчитав число колоний микроорганизмов, развившихся на чашках Петри по всем повторностям соответствующего разведения, определяют среднее число колоний на чашке и далее делают пересчет количества микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы по формуле

$$a = бв/г,$$

где а – число клеток микроорганизмов в 1 г воздушно-сухой почвы; б – среднее число колоний микроорганизмов на чашке Петри; в – соответствующее разведение; г – количество жидкости в пипетке.

Для большей точности учета численности микроорганизмов параллельно микробиологическому анализу определяют процент влажности почвенной пробы и окончательно количество микроорганизмов рассчитывают на 1 г абсолютно сухой почвы.

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы определения бактериального загрязнения почвы?
2. Для выделения бактерий, актиномицетов, дрожжей, грибов какие применяются питательные среды?
3. Как производится подсчет количества микробных тел?
4. На чем основан бактериологический анализ почвы?

Библиографический список

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. Аристовская, Т. В. Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

2 часа

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: научить студентов использованию аборигенной микробиоты для очистки почвы от нефтезагрязнений.

Задача работы: изучить методы выделения чистых культур нефтеоокисляющих микроорганизмов.

Обеспечивающие средства: микроскоп и осветитель, набор красителей, спиртовка, капельница с иммерсией, сырая нефть, среда Чапека.

Задания

1. Приготовление питательных сред для получения накопительных культур.
2. Выделение чистых культур нефтеоокисляющих микроорганизмов.
3. Скрининг выделенных культур нефтеоокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Требования к отчету

Описать:

– состав питательных сред, необходимых для выделения питательной среды для получения накопительных культур;

- как проводится выделение из накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов;
- скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Технология работы

Выделение чистых культур нефтеокисляющих бактерий. Из нескольких проб нефтезагрязненных почв получают накопительные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов на синтетической среде следующего состава (г/л): KNO_3 – 4,0; KH_2PO_4 – 0,6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; вода водопроводная, рН среды 7,0. В колбы с 100 мл жидкой среды указанного состава вносят по 1 мл нефти и небольшое количество нефтезагрязненной почвы. Накопительные культуры получают на качалке (220 об/мин) при 24 °С в течение 7 сут. Из накопительных культур выделяют чистые культуры нефтеокисляющих микроорганизмов по методу Коха на агаризованной среде Чапека. Культуры поддерживают на скошенной агаризованной среде Чапека при +4 °С.

Скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде. Для получения посевого материала выделенных культур бактерий используют среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; NH_4NO_3 – 1,0; MgCl_2 – 0,1; KH_2PO_4 – 3,0; K_2HPO_4 – 7,0; CaCO_3 – 1,0, рН среды 7,0. Для определения степени нефтепотребления культуры выращивают на жидкой среде вышеуказанного состава, в которой источником углерода вместо глюкозы служит сырая нефть (1 мл нефти на 100 мл жидкой среды). Засев производят из расчета 10 мл посевого материала на 100 мл среды. Культивирование проводят в колбах при перемешивании (220 об/мин) с объемом питательной среды 100 мл при 24 °С. Исходное значение рН среды составляет 7,0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования.

Определение содержания остаточной нефти. Содержание нефти в процессе исследования определяют с помощью аппарата – флюорат или же весовым методом путем экстрагирования нефтепродуктов из определенных навесок почвы или объемов жидкой среды гексаном из расчета количества нефти по разности веса в исходных образцах и после эксперимента.

Контрольные вопросы

1. Приготовление питательных сред для получения накопительных культур.
2. Выделение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов.
3. Скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Библиографический список

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. Аристовская, Т. В. Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12

2 часа

КОЛЛОКВИУМ

Цель работы: проверка знаний у студентов по курсу практической микробиологии и биотехнологии.

Задача коллоквиума: изучить основные методы микробиологии по изучению микробиологии.

Задание: повторить материал всех предыдущих лабораторных работ, ознакомиться с методами выделения чистых культур микроорганизмов, а также с их морфологическими особенностями.

Требования к зачету: описать методы выделения чистых культур микроорганизмов, их морфологические особенности, показать умение пересевать культуру и готовить препараты микроорганизмов, работать со светлопольным микроскопом, а также умение приготовить среды и посуду к стерилизации.

Технология работы

1. Практическая работа с использованием препаратов, микроскопа, камеры Горяева, окуляр-микрометра, объектив-микрометра и т. д.
2. Описать методы, применяемые в микробиологии.
3. Результаты работы оформить в виде краткого письменного отчета и сдать преподавателю.

Контрольные вопросы

Описаны после каждой лабораторной работы.

Библиографический список

1. *Аникеев, В. В.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М. : Просвещение, 1977. – 146 с.
2. *Аристовская, Т. В.* Большой практикум по микробиологии [Текст] / Т. В. Аристовская [и др.]. – М. : Высш. шк., 1962. – 491 с.
3. Биотехнология: принципы и применение [Текст] / под ред. И. Хиччитеса [и др.]. – М. : Мир, 1988. – 540 с.
4. *Генкель, П. А.* Микробиология с основами вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. биол. фак. пед. ин-тов / П. А. Генкель. – М. : Просвещение, 1974. – 270 с.
5. *Егорова, Н. С.* Основы учения об антибиотиках [Текст] : учеб. пособие / Н. С. Егорова. – М. : Высш. шк., 1979. – 298 с.
6. Краткий определитель бактерий Берги [Текст] / под ред. Дж. Хоулта. – М. : Мир, 1980. – 496 с.
7. *Литвинов, М. А.* Определитель микроскопических почвенных грибов [Текст] / М. А. Литвинов. – Л. : Наука, 1967. – 303 с.
8. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1990. – 156 с.
9. *Шлегель, Т.* Общая микробиология [Текст] / Т. Шлегель. – М. : Просвещение, 2002. – 490 с.