

САХАЛИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Т. Н. КАЛГАНОВА

**ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Лабораторные работы

Южно-Сахалинск
2011

УДК 579 (076)
ББК 28.4я73
К 17

Печатается по решению учебно-методического совета
Сахалинского государственного университета, 2011 г.

К 17 Калганова, Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы / Т. Н. Калганова. – Южно-Сахалинск: СахГУ, 2011. – 56 с.

ISBN 978-5-88811-351-6

Практикум разработан согласно действующим программам курсов «Микробиология» и «Биотехнология» для студентов вузов дневного и заочного обучения специальностей 020201.65 «Биология» и 020801.65 «Экология», а также направлений подготовки 020200.62 «Биология», 020800.62 «Экология» и 110900.62 «Водные биоресурсы и аквакультура».

Предлагаемые лабораторные работы были неоднократно апробированы при проведении занятий со студентами и могут быть использованы при исследованиях по курсовым и выпускным квалификационным работам.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

В. Н. Ефанов, доктор биологических наук, профессор кафедры экологии и природопользования СахГУ;

М. Ю. Грабович, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии и биохимии клетки Воронежского государственного университета.



© Сахалинский государственный
университет, 2011
© Калганова Т. Н., 2011

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ЗАНЯТИЕ 1. Методы микроскопического исследования микроорганизмов и основные приемы их микроскопирования. Окраска бактерий по Граму	6
ЗАНЯТИЕ 2. Морфология основных групп микроорганизмов и структуры клетки прокариот. Способы окрашивания включений цитоплазмы и структур микроорганизмов	14
ЗАНЯТИЕ 3. Знакомство с питательными средами, методами их приготовления и стерилизации. Посев микрофлоры воздуха	25
ЗАНЯТИЕ 4. Анализ микрофлоры воздуха. Посев микрофлоры воды и почвы	31
ЗАНЯТИЕ 5. Анализ микрофлоры воды и почвы, посеянной методом разбавления	35
ЗАНЯТИЕ 6. Виды брожений. Молочнокислое брожение	37
ЗАНЯТИЕ 7. Виды брожений. Спиртовое брожение	43
ЗАНЯТИЕ 8. Виды брожений. Уксуснокислое брожение	46
ЗАНЯТИЕ 9. Виды брожений. Маслянокислое брожение	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	52
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	54

ВВЕДЕНИЕ

Предлагаемое пособие представляет собой руководство для выполнения лабораторных работ по курсам «Микробиология» и «Биотехнология» для студентов дневного и заочного обучения специальностей 020201.65 «Биология» и 020801.65 «Экология», а также направлений подготовки 020200.62 «Биология», 020800.62 «Экология» и 110900.62 «Водные биоресурсы и аквакультура».

Рекомендуемые работы и задания охватывают основные разделы названных курсов. Дано необходимое описание проводимых микроскопических исследований, перед каждой работой помещен перечень используемых оборудования и материалов. Приведены рецепты приготовления питательной среды мясопептонного агара (МПА) и культур микроорганизмов: сенной палочки (*Bacillus subtilis*) и картофельной палочки (*Clostridium pasteurianum*).

Руководство составлено на базе учебных пособий В. В. Аникеева и К. А. Лукомской «Руководство к практическим занятиям по микробиологии» (1977) и З. В. Васильевой, Г. А. Кириллова и А. С. Ласкина «Лабораторные работы по микробиологии» (1979) и соответствует программам курсов.

Предлагаемые лабораторные работы охватывают основные направления микробиологии и биотехнологии, это знакомство:

- с прокариотной клеткой и ее структурами, используя современные методы их окрашивания и микроскопического исследования;
- с экологическими группами микроорганизмов, исследуя окружающую микрофлору воздуха, воды и почвы методами посевов;
- с систематическими группами микроорганизмов – представителей различных видов брожений и исследование их свойств.

Подобное знакомство с микромиром позволит значительно расширить кругозор студентов, обогатить их представление об окружающей природе, роли и деятельности не видимых человеческим глазом микроорганизмов.

ЗАНЯТИЕ 1

Тема: «Методы микроскопического исследования микроорганизмов и основные приемы их микроскопирования. Окраска бактерий по Граму».

Цель: знакомство с методами микроскопического исследования микроорганизмов и основными приемами микроскопирования.

Материалы и оборудование: покровные стекла, стекла с углублениями, предметные стекла, спиртовки, бензин, препаровальные иглы, стерильные пипетки, дистиллированная вода, фильтровальная бумага, марля, микроскопы, лампы для освещения; настои: гороха, сенной палочки, навоза, суспензия дрожжей; красители: фуксин основной, метиленовый синий, раствор люголя, генцианвиолет.

ХОД РАБОТЫ

1. Познакомиться с правилами работы в лаборатории.
2. Узнать методы микроскопического исследования микроорганизмов.
3. Познакомиться с правилами работы с микроскопом.
4. Рассмотреть технику приготовления живых и фиксированных препаратов микроорганизмов:
 - а) приготовить живые препараты данных настоев и суспензий двумя способами (подкрасить фуксином или метиленовым синим);
 - б) приготовить фиксированные препараты микроорганизмов из имеющихся суспензий и зубного налета (окраска фуксином);
 - в) окрасить микроорганизмы по Граму;
 - г) рассмотреть все приготовленные живые и фиксированные препараты микроорганизмов, используя иммерсионный объектив;
 - д) отметить грам(+) и грам(-) бактерии в культурах, зарисовать.

Основные сведения о методах световой микроскопии

С помощью современного биологического микроскопа можно получить увеличение до 2500 раз и провести идентификацию объекта, рассмотрев его морфологические особенности. Современный световой микроскоп позволяет рассмотреть объекты величиной не менее 0,2–0,3 мкм. Поскольку живые микроорганизмы прозрачны и плохо видны в проходящем свете, то для детального изучения обычно используют фиксированные и окрашенные бактерии. Можно использовать также препараты живых бактерий, в каплю суспензии которых добавлен определенный краситель.

Дополнительные приемы, применяемые для изучения микроорганизмов, позволяют выделить ряд методов для их исследования [1,12].

Метод фазово-контрастной микроскопии

Для этой цели применяют специальные фазово-контрастные устройства, позволяющие видеть контрастное изображение живых микроорганизмов. Оно состоит из набора фазовых объективов, обозначенных «О». Метод основан на различии показателей преломления отдельных участков исследуемой клетки объектов. Свет, проходящий через них, распространяется с разной скоростью, что проявляется в различной яркости изображения отдельных участков, которое получается контрастным.

Микроскопия в темном поле

Здесь используют специальный конденсор, который пропускает только краевые лучи источника света, косо направленные. В результате поле зрения оказывается темным, а объект, освещаемый рассеянным светом, – светлым.

Для микроскопирования в темном поле на верхнюю поверхность конденсора наносят каплю иммерсионного масла,

а на столик помещают предметное стекло с объектом (чтобы не появились пузырьки воздуха). На покровное стекло также наносят каплю масла. Таким образом, нанеся масло на обе поверхности препарата, достигают однородности среды для проходящих лучей света. Одинаковый коэффициент преломления обеспечивает четкость изображения объекта, а темное поле позволяет лучше рассмотреть мелкие детали клетки бактерий.

Метод люминесцентной микроскопии

Наименьшее расстояние, при котором две соседние точки видны под микроскопом раздельно, называют его разрешающей способностью. Чем больше разрешающая способность, тем большее увеличение можно получить под микроскопом. Увеличение разрешающей способности достигается двумя путями:

1. Использованием объективов с большей численной апертурой (она выгравирована на каждом объективе). Наибольшую апертуру имеют иммерсионные объективы.

2. Уменьшением длины волны света, которым освещается препарат. С этой целью исследования проводят в ультрафиолетовом (УФ) свете, длина волны которого меньше, чем в видимом свете, для этих целей имеются специальные Уф-микроскопы. Метод люминесцентной микроскопии основан на том, что объект, освещаемый коротковолновым светом (синим или УФ), способен к свечению. Причем если он содержит химические вещества, флюоресцирующие при действии на них коротковолнового света, имеет место первичная люминесценция. Обычно используют явление вторичной люминесценции, когда свечение объекта происходит после обработки его специальными красителями – флюорохромами. К ним относятся акридиновый желтый, оранжевый и т. д.

Для люминесцентной микроскопии используют обычный микроскоп с набором светофильтров и источником УФ. Первый фильтр – синий, пропускающий длинноволновую часть спектра, помещают перед источником света, а второй – в

окуляр микроскопа, пропускающий только люминесцентное свечение препарата. Для приготовления препарата каплю жидкости с исследуемыми микроорганизмами смешивают с каплей раствора красителя и покрывают покровным стеклом.

Работа с иммерсионным объективом

Объективы микроскопа делятся на сухие и иммерсионные (масляно-погруженные). Сухие объективы (х 8, х 9, х 10, х 20, х 40) применяют при небольших увеличениях (до 500 раз). Между объективом и препаратом находится слой воздуха. Поэтому в связи с различием в показателях преломления стекла, воздуха и препарата часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Для исследования микроорганизмов используют иммерсионные объективы (х 90), дающие увеличение от 600 до 1350 раз, в зависимости от используемого увеличения окуляра (7 х, 8 х, 9 х, 10 х, 15 х.)

При работе с иммерсионным объективом его погружают в каплю кедрового или пихтового масла, нанесенного на препарат. Показатель преломления этого масла близок к показателю преломления стекла, и между стеклом и линзой объектива устанавливается однородная среда. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не меняя своего направления, попадают в объектив и обеспечивают хорошую видимость микроорганизмов.

Иммерсионным объективом пользуются следующим образом. Приготовленный прижизненный, или фиксированный, препарат бактерий сначала рассматривают при помощи объектива сухой системы (х 10, х 20, х 30, х 40), найдя наиболее интересное место на нем. Препарат закрепляют на столике зажимами, в центр его (на покровное стекло или на предметное в случае фиксированного препарата) наносят каплю иммерсионного масла и заменяют сухой объектив на иммерсионный (х 90). Обычно этот объектив отмечен снаружи по периметру черной полосой и имеет подвижно закрепленную линзу. Объектив должен погрузиться линзой в каплю масла, но не касаться вплотную препарата, чтобы не получилось по-

вреждения. Фокус уточняют с помощью микровинта, который используют для детального изучения препарата. При этом следует увеличить освещение, открыв диафрагму конденсора.

Для использования полной силы иммерсионного объектива каплю иммерсионного масла наносят и на поверхность верхней линзы конденсора, опущенного вниз, что обычно делают при темнопольной микроскопии. Затем конденсор поднимают до соприкосновения масла с нижней поверхностью предметного стекла препарата. После работы кедровое масло немедленно удаляют с объектива и препарата. Масло сначала снимают фильтровальной бумагой, а затем тряпочкой, смоченной в бензине. КСИЛОЛ И СПИРТ НЕ ПРИМЕНЯТЬ! ПРИМЕНЕНИЕ ИХ ВЕДЕТ К РАСКЛЕИВАНИЮ линз!

Основные приемы микроскопирования микроорганизмов

Приготовление живых препаратов микроорганизмов

I. Метод раздавленной капли

В центр предметного стекла пипеткой наносят исследуемый материал – каплю суспензии с микроорганизмами. Если взвесь густая, то нужно предварительно разбавить ее дистиллированной водой. Покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее таким образом, чтобы между стеклами не оставалось пузырьков воздуха. Капля должна быть небольшой, чтобы после раздавливания жидкость не выступала за края покровного стекла, излишки жидкости следует убрать фильтровальной бумагой. Препарат из-за высыхания не может долго храниться. Изучать препарат в светлом и темном поле, использовать иммерсионный объектив [1, 4, 12].

II. Метод висячей капли

На чистое покровное стекло нанести каплю суспензии микробов, наложить на него предметное стекло с углублени-

ем, плотно прижимая, перевернуть их. Капля должна висеть на покровном стекле над углублением предметного стекла, то есть в закрытой камере. Висячую каплю рассматривают, пользуясь зеркалом, диафрагму при этом суживают при малом и расширяют при большом увеличении. Метод дает возможность наблюдать микроорганизмы длительное время и следить за делением клеток.

При работе с живыми препаратами микроорганизмов для лучшего видения каплю суспензии можно слегка подкрасить раствором нейтрального красного, а при отсутствии его слабым раствором йода, метиленовым синим или фуксином. Небольшие концентрации красителей не влияют на жизнедеятельность клеток, сохраняющих свою подвижность.

Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов

Для более детального изучения микробов применяют фиксированные препараты. Этот процесс складывается из следующих операций: приготовление мазка, высушивание препарата, его фиксация и окраска [1, 4, 12].

Техника приготовления мазка:

1. На центр чистого предметного стекла нанести каплю суспензии микроорганизмов (если взвесь слишком густая, необходимо разбавить дистиллированной водой).
2. Той же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределить суспензию на 1/3 центральной части поверхности предметного стекла.
3. Дать мазку высохнуть (на воздухе, под лампой или высоко над пламенем горелки).
4. Зафиксировать мазок сухим жаром: закрепив предметное стекло держателем мазком вверх, проводят его сквозь пламя спиртовки плавными круговыми движениями три-пять раз. При этом микроорганизмы убиваются и прочно прикрепляются к стеклу.

5. После охлаждения на стеклянном штативе окрасить мазок: пипеткой наносят на поле мазка краситель на одну-две минуты или более согласно методу окрашивания.

6. После этого краску с мазка смывают на штативе струей воды, излишки воды с нижней поверхности стекла снимают фильтровальной бумагой. Мазок подсушивают под лампой, препарат готов к рассмотрению с помощью иммерсии.

Примечание: при работе с фиксированными препаратами микробов кедровое масло наносят непосредственно на ПРЕДМЕТНОЕ СТЕКЛО, поскольку бактерии прочно закреплены на нем.

Окраска бактерий по Граму

Этот способ позволяет дифференцировать сходные по форме и размерам микроорганизмы, относящиеся к разным видам. Метод основан на способности некоторых форм бактерий образовывать в клетке прочное соединение основных красителей – генцианвиолета и йода, которое не обесцвечивается при последующей обработке спиртом, в результате чего эти бактерии сохраняют сине-фиолетовую окраску и называются грамположительными – грам(+). Другие бактерии не обладают свойством удерживать окраску и при работе спиртом обесцвечиваются. Это грамотрицательные бактерии – грам(-). Отношение к окраске по Граму служит одним из основных признаков бактерии в ее характеристике [13].

Способность бактериальных клеток окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и структуры клеточных стенок. У грам(+) бактерий клеточная стенка на 95 % состоит из муреина (пептидогликана) и тейхоевой кислоты. В состав клеточной стенки грам(-) бактерий входят липопротеиды, липополисахариды, фосфолипиды, незначительное количество (5 %) муреина.

Окраска по Граму связана также с возрастными особенностями культуры: лучше красятся бактерии в молодых двух-, трехдневных культурах.

Техника окраски бактерий по Граму

1. Приготовить фиксированный мазок исследуемой культуры микроорганизмов.

2. Мазок окрасить генцианвиолетом на 1–2 минуты на штативе.

3. Не смывая краситель, вытесняем его раствором люголя, также оставляем на 1–2 мин.

4. Промыть препарат водой.

5. Обработать препарат 95-процентным спиртом или ацетоном: одну-две капли реактива наносят на поле мазка на 1–2 мин.

6. Смыть реактив водой.

7. Провести докрашивание препарата фуксином на 1–2 мин., промыть водой, подсушить, рассмотреть с иммерсией. Грам(+) микроорганизмы при этом окрашиваются в сиренево-фиолетовый цвет, грам(-) – в розово-малиновый.

Контрольные вопросы

1. Какие методы микроскопического исследования вы знаете?

2. Перечислите способы приготовления микропрепаратов.

3. В чем сущность метода окраски по Граму? Какие различия в строении клеточных стенок у грам(+) и грам(-) бактерий?

ЗАНЯТИЕ 2

Тема: «Морфология основных групп микроорганизмов и структуры клетки прокариот. Способы окрашивания включений цитоплазмы и структур микроорганизмов».

Цель: знакомство с морфологией бактерий и способами окрашивания различных включений и структур клетки прокариот.

Материалы и оборудование: предметные стекла в жидкости Никифорова, покровные стекла, стерильные пипетки, чашки Петри, химические стаканы, водяная баня, микроскопы, лампы для освещения, спиртовки, спички, фильтровальная бумага, карболовый фуксин, метиленовый синий, генцианвиолет, раствор люголя, черная тушь, судан-3, концентрированный раствор йода, 40- и 1-процентные р-ры формалина, 1 н р-р HCl, 5-процентный р-р хромовой кислоты, 1-процентный р-р H_2SO_4 .

Культуры: дрожжи, сенная палочка, картофельная палочка.

ХОД РАБОТЫ

1. Познакомиться с морфологией основных групп микроорганизмов и структурными компонентами прокариотной клетки.

2. Рассмотреть методику окраски нуклеоида в клетках дрожжей, описать метод, окрасить препарат, зарисовать при иммерсионном увеличении.

3. Выяснить методы окраски волютина, гликогена, гранулы, включений жировой природы, описать методы, выполнить окраску фиксированных и прижизненных микропрепаратов по этим включениям, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

4. Познакомиться со способами выявления капсул микроорганизмов, окраской жгутиков и спор у бактерий.

5. Приготовить прижизненные микропрепараты по обнаружению капсул в исследуемых культурах бактерий, рассмотреть с иммерсией.

Основные сведения о морфологии микроорганизмов и строении бактериальной клетки

Бактерии составляют наиболее обширную и весьма разнообразную группу микроорганизмов. Это одноклеточные организмы, размножающиеся простым делением клетки. Морфологические различия: по форме, величине, взаимному расположению клеток, по наличию или отсутствию жгутиков и капсул, по способности клеток к спорообразованию. Морфологические признаки учитываются при определении систематического положения микроорганизмов [7, 13, 18, 19, 22].

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

Шаровидные бактерии-кокки

Систематическим признаком при делении родов шаровидных бактерий служат направление плоскости деления клетки и характер взаимного расположения клеток. Диаметр кокков – 0,5–1,2 мкм.

Моно-, или микрококки (род Micrococcus). Их клетки делятся в одной плоскости и сразу после деления располагаются одиночно.

Диплококки (род Diplococcus) и *стрептококки (род Streptococcus)* образуются при делении клеток в одной плоскости, у диплококков клетки располагаются попарно, у стрептококков – в цепочку.

Тетракокки (род Tetracoccus) возникают при делении клеток в двух взаимно-перпендикулярных плоскостях, клетки образуют группы по четыре особи.

Сарцины (род Sarcina) формируются при делении клеток в трех взаимно-перпендикулярных областях, при этом образуются пакеты из восьми-шестнадцати и более клеток.

Стафилококки (род *Staphylococcus*) представлены скоплением клеток, напоминающих виноградные гроздья. Деление клеток идет в нескольких плоскостях.

Помимо правильной шаровидной формы, кокки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки) или бобовидную форму кофейного зерна (гонококки, менингококки). Шаровидные бактерии не имеют жгутиков, неподвижны и споры не образуют. Исключение составляет моче-вая сарцина – *Sarcina ureae*.

Палочковидные бактерии

Это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Палочковидные бактерии различают по величине клеток, их расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клеток палочковидных бактерий колеблется от 0,7 до 15 мкм, ширина – 0,5–1 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры. Большинство бактерий этой формы спор не образует и относится к роду *Bacterium* (обозначают *Bact.*, или *B.*). Те палочковидные бактерии, которые при неблагоприятных условиях способны формировать споры, принято называть бациллами (обозначают *Bacillus* – *Bac.*). Бактерии и бациллы могут располагаться одиночно, попарно или соединяться в цепочки. В последнем случае они называются стрептобациллами, или стрептобактериями.

Извитые бактерии

В зависимости от формы клетки и количества витков их делят на три вида клеток:

- вибрионы (род *Vibrio*) представлены короткими изогнутыми палочками в виде запятой. Клетки вибрионов изогнуты на 1/3 оборота;
- спириллы (род *Spirillum*) имеют вид латинской буквы S. Они значительно крупнее. Длина – 15–20 мкм, клетки имеют два-три витка;

- спирохеты (пор. *Spirochaetales* Bergey) – это очень тонкие длинные клетки, штопорообразные, с большим числом витков. Длина клетки превосходит ширину в 5–200 раз. По числу витков клетки одних видов отличаются от других.

С вибрионами и спириллами можно познакомиться на мазках, приготовленных из настоев навоза или стоячей воды.

Для ознакомления со спирохетами готовят мазки из зубного налета в капле воды. Среди прочих бактерий легко выделяются большая и малая зубная спирохеты (*Spirochaeta macro-* и *microdenta*). Среди структурных компонентов прокариот различают как основные, так и временные.

К **основным** относятся:

- клеточная стенка, имеющая различное строение у грам(+) и грам(-) бактерий;
- цитоплазматическая мембрана с включениями (мезосомы, хроматофоры);
- цитоплазма – гомогенная белково-коллоидная фракция с растворенными в ней компонентами (белками, ферментами, продуктами обменных реакций);
- нуклеоид – ядерное вещество прокариот, представленное молекулой ДНК в виде длинной нити, перекрученной и замкнутой в кольцо, собственно ядерная мембрана отсутствует;
- плазмиды – внехромосомные генетические элементы, имеющие свои небольшие кольцевые молекулы ДНК;
- прочие постоянные включения цитоплазмы – органеллы: рибосомы, хлоросомы, аэросомы, фикобилисомы, карбоксисомы.

К **временным** структурным компонентам прокариот относятся:

- жгутики, возникающие на определенной стадии жизненного цикла и служащие для передвижения бактерий;
- фимбрии, выполняющие функции взаимодействия с другими клетками бактерий (при конъюгации) или с субстратом;
- капсула, или слизистый защитный матрикс, окружающий клетку прокариот снаружи;

- запасные питательные вещества в виде включений – отложений их в цитоплазме. Сюда входят вещества различной природы.

Полифосфаты – представлены волютином. Зерна волютина округлой формы диаметром 0,5 мкм. В них входит комплекс неорганических полифосфатов и РНК, где содержится запас азота и фосфора в клетке. Они служат источником потенциальной энергии и расходуются при голодании бактерий. Волютиновые зерна фиолетово-красного цвета, выражены хорошо при окраске метиленовым синим в клетках дрожжей, молочнокислых и ряда патогенных бактерий.

К резервным питательным веществам относят гранулы углеводной природы: гликоген (животный крахмал) и гранулеза (крахмалоподобное вещество). Гликоген легко выделяется при окраске йодом в клетках дрожжей и аэробных бацилл (гранулы буро-красного цвета). Гранулеза характерна для анаэробных споровых бактерий рода *Clostridium* (гранулы темно-синего цвета). Гликоген и гранулеза являются энергетическим запасом клетки и расходуются при ее голодании.

Жиры в клетках бактерий видны в виде мелких капель, неравномерно распределенных в цитоплазме. Жировые включения накапливаются при обильном питании клеток безазотистыми веществами или являются результатом жирового перерождения цитоплазмы при старении культуры. Их легко можно выявить в клетках дрожжей и аэробных бацилл.

У серных бактерий встречаются включения молекулярной серы, также служащей для них источником энергии. В процессе жизнедеятельности у ряда бактерий происходит накопление зерен аморфного карбоната кальция, кристаллов щавелевой и других кислот, гранул или кристаллов белка. Все виды включений бактериальной клетки можно выявить при помощи специальных цитохимических методов окраски.

Окраска нуклеоида в клетках дрожжей

1. Из суточной культуры дрожжей готовят суспензию (при необходимости разбавляют стерильной дистиллированной водой) и наносят мазок на чистое предметное стекло.

2. Мазок высушивают на воздухе.

3. Добавляют поверх мазка каплю судана-3 на 3 мин., высушивают.

4. Подвергают мазок гидролизу, для чего погружают предметное стекло в стаканчик с 1 н р-ром соляной кислоты, который ставится в водяную баню, предварительно нагретую до 60 °С. При этой температуре р-ра кислоты гидролиз идет 2–3 мин.

5. Затем тщательно промывают мазок водой на стеклянном штативе.

6. Мазок заливают 1-процентным р-ром формалина на 2 мин. и промывают водой.

7. Окрашивают мазок 1-процентным р-ром фуксина на 1–2 мин., промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют с иммерсионным объективом. На розовом фоне цитоплазмы выделяется нуклеотид, окрашенный в ярко-малиновый цвет, в виде одного образования в центре или двух телец, смещенных к полюсам [1, 4].

Окраска волютина дрожжей по методу Омелянского

1. Сделать тонкий мазок культуры дрожжей, высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем горелки.

2. Окрасить мазок фуксином на 1 мин., затем смыть краситель водой на штативе.

3. Добавить на мазок одну каплю 1-процентного р-ра H_2SO_4 на 30 сек., смыть водой.

4. Окрасить мазок метиленовым синим на 1 мин., промыть водой, высушить на воздухе. Микроскопировать с иммерсией. На голубом фоне цитоплазмы видны красные зерна волютина.

Окраска волютина по методу Леффлера

1. Тонкий фиксированный мазок культуры микроорганизмов (дрожжей или *Vac. subtilis*) окрашивают метиленовым синим Леффлера в течение 3 мин.

2. Мазок промывают водой, не высушивают, а накрывают покровным стеклом, микроскопируют при увеличении 40 или 90. Зерна волютина на препарате окрашены в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма – в голубой.

3. Для более четкой картины волютина под покровное стекло добавляют каплю 1-процентного р-ра серной кислоты. При этом цитоплазма обесцвечивается, а зерна волютина сохраняют красно-фиолетовую окраску.

Окраска гликогена и гранулы

I. Для обнаружения гранулы на предметное стекло наносят взвесь культуры *Clostridium pasteurianum*, добавляют каплю слабого раствора люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют при объективе 40 или 90. Гранула окрашивается в темно-синий цвет.

II. Для обнаружения гликогена из культуры дрожжей готовят мазок, фиксируют смесью Никифорова в течение 5 мин. Затем мазок окрашивают концентрированным раствором люголя (30–40 сек.), промывают водой, накрывают покровным стеклом (40 х). Гранулы гликогена окрашиваются в красновато-бурый цвет.

Выявление включений жировой природы

1. Жировые включения в клетках некоторых дрожжей можно видеть и без специальных методов окраски, пользуясь прижизненным микропрепаратом. В клетках дрожжей можно видеть крупные капли жира, сильно преломляющие свет.

2. У бактерий жировые включения легче выявляются на окрашенных препаратах. К капле водной взвеси микроорганизмов на предметном стекле добавляют каплю раствора

судана-3, накрывают покровным стеклом и микроскопируют при увеличении 40. Судан-3 растворяется в жировых включениях, окрашивая их в оранжево-красный цвет, а жироподобные вещества – в желтый.

Контрастная окраска жира

К капле густой суспензии микроорганизмов на предметном стекле добавляют одну каплю 40-процентного р-ра формалина на 5 мин., затем одну каплю метиленового синего на 10 мин., после чего наносят каплю р-ра судана-3 и оставляют на 5 мин. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют при объективах 40 или 90. Жировые включения окрашиваются в красно-оранжевый цвет, цитоплазма – в синий.

Выявление капсул на негативном прижизненном препарате

1. Многие виды бактерий на определенной стадии развития формируют капсулу, ее образованию способствует избыток углеводов и солей кальция в питательной среде. Капсула представлена слизистым слоем, где присутствуют полисахариды: декстраны, галактаны, целлюлозы. Сюда входят и полипептиды, состоящие главным образом из цепочек молекул глютаминовой кислоты. Химический состав капсул различных бактерий характеризуется строгой специфичностью. Для некоторых бактерий наличие капсулы – важный диагностический признак.

2. На обезжиренное предметное стекло наносят большую каплю неразбавленной черной туши и в нее вносят каплю исследуемой культуры микроорганизмов. Смесь тщательно перемешивают и накрывают покровным стеклом, которое осторожно прижимают к предметному полоской фильтровальной бумаги. Препарат микроскопируют при увеличении х 40. На темном фоне туши выявляются прозрачные зоны капсул вокруг резко очерченных клеток.

Окраска жгутиков по методу Шимвелла

Многие палочковидные бактерии, вибрионы и спириллы на поверхности клетки несут жгутики. Из кокковых форм жгутики имеют лишь единичные виды бактерий, например *Planosarcina ureae*. Для окраски жгутиков следует использовать молодые 6–12-часовые культуры микроорганизмов *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*.

1. Каплю суспензии микроорганизмов наносят на предметное стекло, не размазывая, чтобы не повредить жгутики, высушивают препарат на воздухе.

2. Фиксируют препарат парами 40-процентного формалина 3–5 мин. Для этого препарат помещают в чашку Петри на обрезки стекла над двумя каплями фиксатора. Фиксированный препарат обрабатывают раствором танина-1 в течение 15 мин.

3. Раствор сливают, препарат промывают раствором танина-2, оставляя с ним на 10 мин.

4. Затем раствор танина-2 сливают, препарат промывают водой.

5. Заливают препарат 1-процентным р-ром генцианвиолета на 3–5 мин. Можно слегка подогреть до образования паров.

6. Препарат окончательно промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют, пользуясь иммерсионным объективом. На препарате видны клетки бактерий, окрашенные в ярко-фиолетовый цвет со жгутиками в виде тончайших сиреневых нитей.

Окраска спор у бактерий по методу Циля

Образование спор у бактерий следует рассматривать как один из этапов в жизненном цикле клетки, связанный с переживанием клеткой неблагоприятных условий. В период спорообразования в бактериальной клетке наблюдается высокий уровень обменных процессов. В районе протоплазмальной зоны накапливаются НК, запасные белки, липиды, углеводы, некоторые минеральные соединения: соли магния, кальция. Появляется новая дипиколиновая кислота, которая в соединении с солями Са придает споре высокую термостойкость.

Переход протоплазмы в зрелую спору характеризуется резким скачком в светопреломлении, слабосветящаяся протоплазма начинает сильно преломлять свет и ярко светиться.

Зрелая спора представлена густой цитоплазмой с тяжами ядерного вещества. Снаружи цитоплазма покрыта цитоплазматической мембраной и многослойной оболочкой: внутренней – интиной, средней – корой (кортексом), наружной – экзидиной. Некоторые виды бактерий на поверхности споры имеют воздушный мешок, называемый экзоспориумом.

У бактерий выделяют три типа спорообразования: бациллярный – спора занимает центральное положение в клетке, клостридиальный – спора занимает эксцентричное положение, плектридиальный – спора формируется полярно. Сформировавшиеся свободно лежащие споры различают по форме (округлая, продолговатая, эллипсоидная) и величине.

Ввиду слабой проницаемости многослойных оболочек споры бактерии в этом случае при обычной окраске мазка не прокрашиваются и под микроскопом имеют вид бесцветных, ярко светящихся телец.

Поэтому методы окраски спор основаны на применении слабых кислот, разрыхляющих оболочку споры, и дальнейшей окраски мазка сильным красителем при нагревании. Окрашившийся протопласт споры обладает высокой кислотостойкостью по сравнению с протопластом вегетативной клетки. Он не обесцвечивается при последующей дифференциации мазка в кислоте и сохраняет воспринятую им окраску. Вегетативные клетки бактерии полностью отмываются в кислоте и на препарате имеют цвет дополнительного красителя.

1. Тонкий мазок из культуры микроорганизмов высушить на воздухе и залить 5-процентным р-ром хромовой кислоты на 5 мин.

2. Промыть мазок водой, накрыть квадратиком фильтровальной бумаги, залить р-ром карболового фуксина на 6–8 мин. при нагревании до образования паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. По мере испарения краситель периодически добавляют, не давая препарату подсохнуть.

3. Тщательно промыть мазок водой и дифференцировать в 1-процентном р-ре серной кислоты 30–60 сек. до приобретения им слаборозовой окраски. При этом краситель под действием кислоты полностью уходит из цитоплазмы вегетативных клеток. Зона протормы в спороносных клетках и зрелые споры остаются окрашенными.

4. Мазок немедленно промыть водой (после действия H_2SO_4) и докрасить р-ром метиленового синего в течение 10–15 мин.

5. Мазок окончательно промыть, высушить на воздухе и микроскопировать с иммерсией. Споры и зона протормы окрашиваются на препаратах в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий или голубой.

Контрольные вопросы

1. На какие три основные группы делят бактерии по их форме?
2. Чем отличаются внешне сарцины от стафилококков?
3. Чем характеризуются бациллы?
4. Назовите структурные основные компоненты клетки прокариот?
5. Какие структурные элементы бактериальной клетки относят к временным?
6. Какие питательные вещества относятся к резервным, или запасным, в клетках прокариот?
7. Как окрасить нуклеоид в клетках дрожжей?
8. В чем сущность метода окраски запасных питательных веществ: волютина, гранулезы, гликогена, жировых веществ?
9. Как выявить капсулы на прижизненном препарате бактерий? Из каких веществ состоят капсулы?
10. Как отличить клостридиальную форму бацилл от плектридиальной?
11. В чем сущность метода окраски спор у бактерий по методу Циля?

ЗАНЯТИЕ 3

Тема: «Знакомство с питательными средами, методами их приготовления и стерилизации. Посев микрофлоры воздуха».

Цель: познакомиться с методами стерилизации и приготовления питательных сред на примере МПА.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, стеклоглафы, техномимические весы с разновесами, плитка, дистиллированная вода, стеклянные палочки, сушильный шкаф, термостат, химический стакан, полусинтетический МПА.

ХОД РАБОТЫ

1. Познакомиться с основными средами, методами стерилизации посуды.
2. Приготовить питательную среду из готового полусинтетического порошка МПА.
3. Посеять микрофлору воздуха в различных вариантах опыта.

Основные сведения о питательных средах

Различные питательные среды используют для выделения, выращивания и длительного сохранения микроорганизмов в культурах [1, 4].

Основные требования к питательным средам следующие:

- достаточное количество питательных веществ;
- определенная реакция среды, являющаяся оптимальной для изучаемых микроорганизмов;
- абсолютная стерильность, обеспечивающая возможность получения в среде чистых культур изучаемых бактерий.

По физическому состоянию питательные среды бывают плотные, жидкие и полужидкие. В состав плотных питательных сред входит агар-агар или желатин. В микробиологии

используют агар-агар, поскольку он не используется микроорганизмами и затвердевает при температуре 30 °С.

По составу питательные среды делятся на естественные (натуральные), искусственные (синтетические) и полусинтетические.

Натуральные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения (мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и др.), поэтому точный состав этих сред неизвестен. Их используют в том случае, когда хотят вырастить различные виды микроорганизмов.

Состав синтетических питательных сред точно известен, и их используют при изучении характерных особенностей обмена веществ у различных микроорганизмов.

Чаще всего обычно используют полусинтетические среды. В их состав, кроме веществ известной химической природы, входят продукты растительного и животного происхождения. Примером таких сред могут быть мясопептонные среды, в которые, кроме мясного экстракта и пептона, входят: поваренная соль, фосфат калия. Полусинтетические среды хороши для выращивания определенных групп микроорганизмов, а также для выделения из среды продуктов их жизнедеятельности: антибиотиков, витаминов.

Для выращивания определенного вида микроорганизмов используют элективные питательные среды. В них создаются благоприятные специфические условия для разведения определенного вида организмов. В такой среде интенсивно растет приспособленный к ней микроорганизм и угнетается размножение других видов. Например, в среде Виноградского развиваются только нитрифицирующие бактерии.

Методы стерилизации посуды и питательных сред

Стерилизация – важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов. Стерилизуют посуду, инструменты и сами питательные среды, используемые в работе. Существует термическая и холодная стерилизация.

Термическая стерилизация осуществляется горячим воздухом, насыщенным под давлением паром, прокаливанием на огне, кипячением и др.

1. Прокаливание на огне: в пламени горелки или спиртовки обычно стерилизуют петли и иглы для посева, предметные стекла, инструмент.

2. Кипячение – в течение 30 мин.: обычно кипятят шприцы, иглы, пищевые продукты и др. При этом могут сохраняться споры бактерий.

3. Стерилизация сухим жаром – в специальном сушильном шкафу, как правило, стерилизуют хорошо вымытую посуду: колбы, пробирки и др.; обычно каждый предмет завертывают в бумагу. При температуре 160–170 °С погибают не только все микроорганизмы, но и их споры.

4. Стерилизация паром проводится при температуре 100–120 °С, так как во влажной атмосфере микроорганизмы погибают быстрее при более низкой температуре.

Существует два способа стерилизации паром:

а) стерилизация насыщенным паром под давлением (примерно в 1 атм.) обычно осуществляется в автоклаве при температуре около 120 °С. Микроорганизмы и их споры погибают через 30–40 мин. Этот способ не приемлем для тех сред, которые содержат в своем составе белки или другие вещества, разрушающиеся при высокой температуре;

б) стерилизация текущим паром в аппарате Коха при температуре 100 °С в течение 30–40 мин. Если его нет, можно использовать простую кастрюлю, наливая в нее небольшой слой воды. Однако следует помнить, что споры бактерий не погибают при однократном нагревании. Поэтому для полного обеспложивания текущим паром применяют повторные стерилизации, всего три-четыре раза с интервалом через сутки. В период между нагреваниями жизнеспособные споры прорастают, а при повторном нагревании развивающиеся молодые клетки погибают. Такой метод называют тиндализацией, или дробной стерилизацией.

5. Пастеризация – метод, применяемый для уничтожения неспороносных бактерий в питательных средах (вине, молоке), теряющих свои качества при кипячении. Пастеризуют среды в течение 15–30 мин. при температуре 50–60 °С или в течение 5–10 мин. при температуре 70–80 °С в водяной бане или термостатах.

Холодная стерилизация проводится путем фильтрования или облучения УФ-лучами тех сред, которые не выдерживают нагревания, содержащие белки, витамины, антибиотики:

а) стерилизация фильтрованием – применяется для жидкостей, не выдерживающих нагревания. Для этого используют мелкопористые фильтры, в последнее время распространены мембранные (задерживающие бактерии и их споры и даже вирусов и бактериофагов). Перед фильтрованием фильтры стерилизуют кипячением. Само фильтрование ведется под вакуумом;

б) стерилизация УФ-лучами ведется с применением кварцевых ламп, которые пропускают УФ-лучи. Питательные среды и другие предметы помещают на расстоянии 20–30 см от источника света на 20 мин. При этом воздействии погибают микроорганизмы, но остаются живыми их споры. Конкретно стерилизация различных сред описана в специальных источниках, справочниках.

Приготовление питательной среды на примере МПА

Питательная среда МПА состоит из мясного экстракта, пептона, хлорида натрия, дигидрофосфата натрия и агара-агара.

Для приготовления питательной среды (на одного студента) 1,5 г порошка готового полусинтетического МПА заливают в химическом стакане 50 мл дистиллированной воды, перемешивая, доводят раствор до кипения и, не охлаждая, осторожно через воронку разливают в чашки Петри или четыре пробирки. При этом среда не должна попадать на верхнюю часть пробирки. Пробирки закрывают ватными пробками, обвязанными марлей, и стерилизуют в автоклаве.

Мясопептонный агар (МПА) можно приготовить и таким образом: 500 г мяса измельчают, заливают 1 л воды и настаивают в течение 12–15 часов при комнатной температуре, затем кипятят в течение 30 мин., а после охлаждения отвар процеживают через два-три слоя марли или полотна. Наливают в кружку и при подогревании и помешивании добавляют 0,5 г пептона и 25 мг поваренной соли. Затем в горячем состоянии фильтруют через двойной бумажный фильтр.

После остывания проверяют рН по лакмусу или универсальному индикатору и устанавливают слабощелочную реакцию, добавляя 10-процентный р-р едкого натра. К полученному мясопептонному бульону прибавляют 1,5 г агар-агара и доводят до кипения. Расплавленный мясопептонный агар в горячем состоянии фильтруют через гигроскопическую вату с марлей и быстро разливают по 15 мл в пробирки через воронку. Пробирки закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве.

Питательная среда затем используется для выращивания микроорганизмов при исследовании воды, почвы, воздуха.

Посев микрофлоры воздуха

В окружающей нас среде, в атмосфере содержатся как сапрофитные микроорганизмы почвы, попадающие из земли, так и микроорганизмы, обитающие на слизистых оболочках дыхательных путей человека в закрытых помещениях. Могут встречаться и патогенные формы, которые способны выселяться в воздухе в закрытых помещениях.

Посев производится следующим образом: расплавленный агар-агар разливают по чашкам Петри, чуть приоткрывая верхнюю крышку во избежание заноса микробов. Налитый до 1/3 донной крышки чашки Петри агар МПА остужают, вращая чашку по столу. Можно поставить в холод. Затем чашку этикетировать, на крышке карандашом по стеклу указывают дату, фамилию исследователя и вариант опыта. В изучаемом помещении крышку чашки открывают на 5 мин. Чашки Петри должны стоять на горизонтальной поверхно-

сти в помещении вдали от сквозняков и исследователя. Через 5–10 мин. чашки закрыть и поставить в термостат при 25–28 °С. В термостате чашки держат крышками вниз, чтобы конденсирующаяся влага не смачивала посева. Через два-три дня на поверхности наблюдают развитие колоний микроорганизмов. Их подсчет и анализ производят на шестой-седьмой день после посева [1, 4].

Контрольные вопросы

1. Какие питательные среды (их типы) используются для выращивания микроорганизмов?
2. Что такое элективные питательные среды, для чего они применяются?
3. В чем состоит сущность методов стерилизации, пастеризации?
4. Какие методы стерилизации вы знаете?
5. Каким образом производят посев микрофлоры воздуха?

ЗАНЯТИЕ 4

Тема: «Анализ микрофлоры воздуха. Посев микрофлоры воды и почвы».

Цель: знакомство с микрофлорой воздуха.

Материалы и оборудование: предметные стекла, чашки Петри, термостат, сушильный шкаф, теххимические весы, химический стакан, стеклянная палочка, разновесы, электроплитка, кристаллизаторы со стеклянными штативами, стерильные пробирки, колбы на 100 и 50 мл, дистиллированная стерильная вода, фуксин, раствор люголя, генцианвиолет, спирт, колонии микроорганизмов, выросшие на МПА в чашках Петри при посеве микрофлоры воздуха.

ХОД РАБОТЫ

1. Описать колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри, по плану. Рассчитать количество микроорганизмов в 10 л воздуха.
2. Из интересующих колоний приготовить окрашенные по Граму мазки микроорганизмов, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.
3. Посеять микрофлору воды и почвы методом разбавления.

Расчеты количества микроорганизмов при прямом посеве из воздуха и план описания колоний, выросших на агаровых пластинках в чашках Петри

Подсчитываем общее количество колоний микроорганизмов, выросших в чашке Петри. Из одной клетки микроорганизмов вырастает по одной колонии. Колонии делятся по размерам (Д – диаметру): крупные (Д = 4–6 мм), средние (Д = 2–4 мм), мелкие (Д = 1–2 мм), точечные (Д = менее 1 мм). Крупные и средние колонии просчитываются полностью. Для удобства поле чашки Петри делят на сектора, просчитывая колонии в каждом секторе и затем суммируя результат. Расчет числа мел-

ких и точечных колоний ведут с использованием «глазка» – поля зрения в 1 см². Вырезается квадрат (3 х 3 см) из миллиметровой бумаги, в центре которого делается «глазок» – поле в 1 см². Передвигая квадрат с нижней стороны чашки Петри, в трех-пяти участках различных секторов ее дна просчитывается полное количество всех мелких и точечных колоний, попавших в поле зрения 1 см². Затем по всем участкам подсчитывают среднее количество микроорганизмов в 1 см² и делают перерасчет на всю площадь чашки Петри.

Если А – среднее количество микроорганизмов в 1 см², то на площади чашки Петри 78,5 см² содержится «Х» мелких и точечных колоний микроорганизмов: А микр. – в 1 см², Х микр. – в 78,5 см²:

$$X = A \cdot 78,5 / 1.$$

Затем полученное число мелких и точечных колоний суммируют с количеством средних и крупных колоний микроорганизмов, подсчитанных на всей площади чашки Петри. Делаем расчет количества микробов в 10 л воздуха. По приблизительным подсчетам (Омелянский) на площади в 100 см² оседает в течение пяти минут столько микроорганизмов и спор, сколько их содержится в 10 л воздуха. Если в чашке Петри выросло всего N колоний микроорганизмов, то в 10 л воздуха содержится «Х» микроорганизмов:

- на площади 78,5 см² – № колоний,
- на площади 100 см² – X колоний:

$$X = N \cdot 100 / 78,5.$$

Допускается, что каждая колония возникла из одной клетки или споры. Производя расчеты, выясняют различия в количественном составе микрофлоры помещений, где производится посев из воздуха. Можно поставить опыты с антибиотиками, фитонцидами или ультрафиолетовым облучением и сделать выводы, как влияют на рост колоний указанные факторы.

Описание колоний микробов, выросших на питательной среде, проводят по следующим показателям:

- а) форма колонии – округлая, амебоидная, ризоидная;

- б) оптические свойства – прозрачная, матовая, флюоресцирующая, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая;

- в) цвет колонии;

- г) поверхность колонии – гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая;

- д) профиль колонии – плоский, выпуклый, кратерообразный, врастающий в агар;

- е) край колонии – ровный, волнистый, лопастной, ризоидный и т. д.;

- ж) структура колонии – однородная, мелко- или крупнозернистая;

- з) консистенция – маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая.

Из воздуха прорастает от 30 до 60 % всех обитающих здесь микроорганизмов и спор.

Микроскопическое обследование микроорганизмов из наиболее интересных колоний, выросших на питательной среде в чашках Петри

Приготавливают фиксированные окрашенные препараты и рассматривают их под микроскопом с иммерсионным объективом. Определяют, к какой группе относятся обнаруженные микроорганизмы (кокки, палочки, сарцины, дрожжи, грибы), устанавливают, как они делятся по Граму [1, 4].

Посев микрофлоры воды и почвы методом разбавления

Готовят суспензию почвы или берут пробу воды (лучше из закрытого водоема).

Суспензию почвы готовят следующим образом: 5 г исследуемой почвы заливают в колбе 50 мл дистиллированной воды, тщательно размешивают, затем дают взвеси отстояться 5 мин. 1 мл из отстоявшейся суспензии почвы (или 1 мл исследуемой воды) помещают в колбу на 100 мл с 99 мл дистиллированной воды, получая первое разбавление до 0,01, в 100

раз. Содержимое колбы взбалтывают, стерильной пипеткой отбирают 1 мл воды и переливают в пробирку с 9 мл стерильной воды – получают разбавление до 0,001. Отбирая из пробирки по 1 мл жидкости и перенося ее в пробирку с 9 мл стерильной воды, получаем разбавление до 0,0001 и т. д. При разбавлении каждый раз пользуются стерильной водой и посудой (пипеткой, колбой).

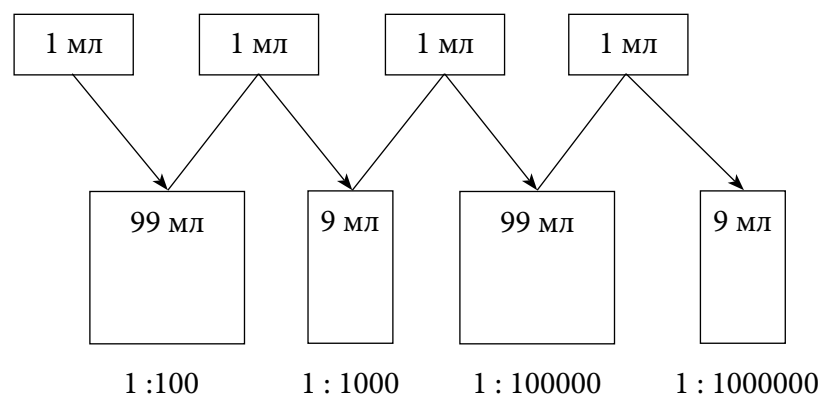


Рис. 1. Общая схема разбавления исследуемой жидкости.

После тщательного взбалтывания содержимого сосудов из каждого берут 0,1–1 мл жидкости и выливают в отдельные чашки Петри на еще теплый агар-агар. Чашки этикетировывают, отмечая степень разбавления, оставляют на неделю в термостате при $T = 23\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Закладку опыта можно осуществить бригадой, отдельно исследовать микрофлору воды и микрофлору воздуха. В отчете о работе приложить схему разбавления суспензии почвы и воды, расчеты количества микроорганизмов в 1 мл воды или 1 г почвы [1, 4].

ЗАНЯТИЕ 5

Тема: «Анализ микрофлоры воды и почвы, посеянной методом разбавления».

Цель: выполнить анализ микрофлоры воды и почвы, выросшей в чашках Петри и посеянной по методу разбавления.

Материалы и оборудование: чашки Петри с посевами микрофлоры на среде МПА, дистиллированная вода, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, лампы, красители: генцианвиолет, раствор люголя, спирт, карболовый фуксин.

ХОД РАБОТЫ

1. Сделать общий подсчет колоний в чашке Петри и рассчитать количество микроорганизмов в 1 мл исходной посевной воды или почвенной суспензии.

2. Описать колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри на МПА при посеве микрофлоры воды и суспензии почвы, по плану.

3. Из наиболее интересных колоний сделать мазки микроорганизмов, окрасить по Граму, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

Подсчет колоний в чашках Петри при посевах микрофлоры воды и почвы ведется аналогично с предыдущей работой, таким образом, вначале рассчитывается число крупных и средних колоний, выросших на всей площади чашки, которая для удобства подсчета делится на секторы. Затем рассчитывается число мелких и точечных колоний вначале в площади «глазка» – 1 см^2 в различных участках чашки Петри, затем среднее количество колоний в 1 см^2 пересчитывается на площадь чашки Петри ($78,5\text{ см}^2$) и суммируется с числом средних и крупных колоний.

После этого ведется пересчет числа колоний на 1 мл исходной посеянной жидкости с учетом разбавления.

ЗАНЯТИЕ 6

Допустим, что А колоний выросло на всей площади чашки Петри при посеве из разбавления 1/100 мл. Тогда Х колоний будет содержаться в 1 мл исходной жидкости (воды или почвенной суспензии):

$$A : 1/100 = X : 1$$
$$X = (A \times 1) / (1/100) = A \times 100 \text{ (колоний / мл)}.$$

Поскольку из каждой клетки микроорганизмов вырастет одна колония, то подсчитываемое количество Х покажет загрязненность воды микроорганизмами или богатство ими почвенной суспензии.

Степень загрязненности водоемов различными микроорганизмами соответствует определенным зонам сапробности:

а) олигосапробная, или малозагрязненная, зона содержит микроорганизмы (м-о) от 10^1 до 10^3 м-о/мл;

б) мезосапробная, или зона средней загрязненности, содержит от 10^3 до 10^6 м-о/мл;

в) полисапробная, или сильнозагрязненная, зона содержит до 10^6 и более микроорганизмов на мл.

4. Сделать вывод, к какой зоне сапробности относится анализируемая вами вода или почвенная суспензия. Зарисовать окрашенные по Граму микроорганизмы, сделать вывод об их принадлежности к группе грам(+) или грам(-) микроорганизмов [1, 4, 16, 18, 19].

Контрольные вопросы

1. В какой среде – почве, воде, воздухе – наиболее обильно представлены микроорганизмы?

2. Какие методы изучения количественного состава микробов воздуха, воды, почвы вы знаете?

3. В чем сущность метода серийных разбавлений воды и суспензий?

Тема: «Виды брожений. Молочнокислое брожение».

Цель: познакомиться с химизмом молочнокислого брожения, с качественными реакциями на молочную кислоту, с морфологией молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование: свежее и кислое молоко, ряженка, простокваша, кислые сливки, сметана, кефир, сливочное масло, рассолы капусты, огурцов, 0,1 н р-р NaOH, 10-процентной серной кислоты, насыщенный р-р CuSO_4 , 2-процентного спиртового тиофена, 2-процентный р-р KMnO_4 , 0,5-процентный аммиачный р-р AgNO_3 , спиртовой 5-процентный р-р фенола, концентрированная H_2SO_4 , 5-процентный р-р FeCl_3 , р-р фенолфталеина, водный р-р метиленового синего, жидкость Никифорова, р-р генцианвиолета, р-р люголя, 96-процентный спирт, р-р карболового фуксина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, настольные лампы, стеклянные штативы с кристаллизаторами, промывалки.

ХОД РАБОТЫ

1. Сделать качественные реакции на молочную кислоту, записать уравнения реакций.

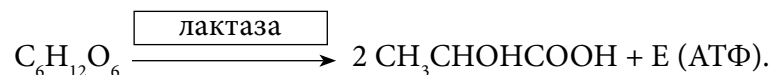
2. Определить кислотность молока, вычислить количество молочной кислоты в 100 мл молока и увеличение кислотности по мере скисания молока.

3. Познакомиться с морфологией молочнокислых бактерий. Приготовить препараты, окрасить метиленовым синим и по Граму, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

Брожение – эволюционно наиболее древний и примитивный способ получения энергии, характерный для ряда групп прокариот. Основные типы брожений – спиртовое, молочнокислое и маслянокислое – открыты Л. Пастером (1860-е годы), хотя продукты брожений были известны человеку с незапамятных времен [3, 5, 7, 9, 11, 22].

Химизм молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO_2 и др.

К первой группе относятся: молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки.

Представители гомоферментативного брожения

МОЛОЧНОКИСЛЫЙ СТРЕПТОКОКК (*Streptococcus lactis*)

Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками – стрептококки. Микроорганизмы грам(+), оптимальная температура развития – 30–35 °С. Сбраживает молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10–12 часов.

СЛИВОЧНЫЙ СТРЕПТОКОКК (*Streptococcus cremoris*)

Встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

БОЛГАРСКАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium bulgaricum*)

Неподвижная, грам(+), располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития – 40–45 °С.

АЦИДОФИЛЬНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium acidophilum*)

По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

ОГУРЕЧНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium cucumeris*)

Короткая, грам(+) бактерия, неподвижная. Развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Ко второй группе гетероферментативных бактерий относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. Fermenti*, *L. brevis*), а также кефирные дрожжи и молочная плесень. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, что является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах. В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

Представители гетероферментативного брожения

КАПУСТНАЯ ПАЛОЧКА (*Lactobacterium brassicae*)

Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, грам(+), сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития – 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовых бактерий, попадающих в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

КЕФИРНЫЕ ДРОЖЖИ (*Saccharomyces kefir*), переводящие молочный сахар (лактозу) в спирт, небольшое количество которого вырабатывается этими организмами.

МОЛОЧНАЯ ПЛЕСЕНЬ (*Oidium lactis*)

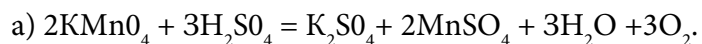
Можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими

ми размерами. Окисляет молочную кислоту до CO_2 и воды, ухудшая качество скисшего молока.

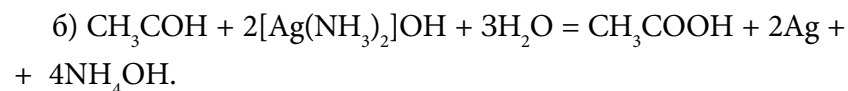
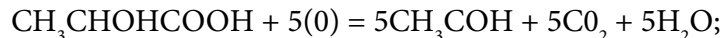
Качественные реакции на молочную кислоту

1. Определение уксусного альдегида

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10-процентного р-ра серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2-процентный р-р (2 мл) KMnO_4 . В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с KMnO_4 до CH_3COH (уксусный альдегид):



Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (смачивают бумагу вначале 0,5-процентным р-ром AgNO_3 , затем раствором NH_4OH . Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:



2. Реакция Уффельмана (проба с фенолом)

В пробирку к 10 мл 5-процентного р-ра фенола добавить несколько капель 5-процентного р-ра хлорного железа (FeCl_3). Наблюдаем образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым.

3. Реакция со спиртовым раствором тиофена

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель насыщенного р-ра медного купороса.

Нагревают при потряхивании на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. При охлаждении добавляют три-пять капель 0,2-процентного р-ра тиофена в спирту. В присутствии молочной кислоты возникает вишнево-красное окрашивание.

Определение кислотности молока

В широкодонную колбу объемом 150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре $30\text{--}35^\circ\text{C}$ до следующего занятия. В другой порции молока определяют его исходную кислотность. Для этого в коническую колбу на 50 мл наливают 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и две-три капли фенолфталеина. Смесь тщательно взбалтывают и титруют 0,1 н р-ром едкого натра до слабозименой окраски индикатора. Рассчитывают кислотность в градусах Тернера. Градус Тернера ($^\circ\text{T}$) – условная величина, равная количеству миллилитров 0,1 н р-ра щелочи, израсходованного на нейтрализацию 100 мл молока.

Пример расчета: на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1 н р-ра щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

5 мл щелочи – 10 мл молока;

x мл щелочи – 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит:

$$X = 5 \cdot 100/10 = 50^\circ\text{T}.$$

Кислотность парного молока колеблется от 10 до 25°T . Предельная кислотность молока колеблется от 110 до 115°T .

Приготовление препаратов из молочнокислых продуктов

Нанести одну каплю какого-либо молочного продукта на предметное стекло, разбавить с каплей дистиллированной воды и сделать тонкий мазок, чуть подсушить на воздухе, а затем зафиксировать с одновременным обезжириванием смесью Никифорова (не менее 10 мин.). Окраску производят в

течение 3–5 мин. водным раствором метиленового синего, промывают водой, высушивают и микроскопируют с применением иммерсионного микроскопа.

Микрофлору рассолов капусты и огурцов препарируют обычным способом, без обезжиривания смесью Никифорова. Окраску мазка производят метиленовым синим или карболовым фуксином 3–5 мин. [1, 3, 4, 5, 22].

ЗАНЯТИЕ 7

Тема: «Виды брожений. Спиртовое брожение».

Цель: познакомиться с химизмом и качественными реакциями спиртового брожения, с морфологией возбудителей этого вида брожения.

Материалы и оборудование: дрожжи пекарские, 10-процентный р-р сахарозы, 10-процентный р-р едкого натра, йод кристаллический, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или $\text{Ca}(\text{OH})_2$, спиртовки или плитки, колба на 200–250 мл, пробка с газоотводной трубкой, штатив, концентрированная серная кислота, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ кристаллический.

За час до занятия настоять в колбе дрожжи, 50 мл 10-процентного р-ра сахарозы и около 1 г дрожжей.

ХОД РАБОТЫ

1. Познакомиться с химизмом и морфологией микроорганизмов, приготовить препараты, окрасить, зарисовать.
2. Выполнить качественные реакции, записать уравнения реакций.
3. Провести измерения размеров клеток дрожжей.
4. Заложить опыты на маслянокислое и уксуснокислое брожение.

Химизм и представители спиртового брожения

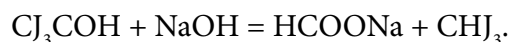
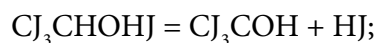
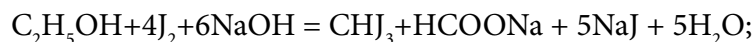
Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе – дикие дрожжи. К ним относятся дрожжевые грибы рода *Mycoderma* и *Torula*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся: *Saccharomyces cerevisiae* и *S. vini*, *S. ellipsoides*. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения, вследствие чего интенсивнее идут

процессы брожения. Спиртовое брожение идет в анаэробных условиях, тогда как размножение дрожжей происходит при широком доступе кислорода при оптимальных температурах 30–35 °С. Образующийся спирт вреден для дрожжей, и при накоплении его брожение прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15 % спирта. Суммарно процесс брожения выражается следующим уравнением: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + CO_2 + 130 \text{ кДж (31 ккал)}$ [1, 4, 12].

Качественные реакции на брожение

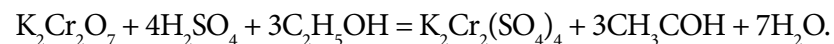
1. Реакция с кристаллическим йодом

К 10 мл бродящей жидкости в пробирку добавить 1–2 мл концентрированного раствора 10-процентной щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С). Затем добавляют несколько кристалликов йода и снова нагревают. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах:



2. Реакция с двуххромовокислым калием

В пробирку с 2–3 мл исследуемой жидкости добавляем кристаллик двуххромовокислого калия и несколько капель концентрированной серной кислоты, смесь нагреваем на спиртовке. Цвет меняется до зеленого вследствие восстановления хрома:



Выделяющийся уксусный альдегид ощутим по запаху.

3. Обнаружение углекислого газа

В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл 10-процентного р-ра сахарозы и около 1 г пекарских дрожжей, предварительно разведенных в 10 мл 10 % сахарозы. Колбу закрывают пробкой с изогнутой трубкой, нижний конец которой погружают в пробирку с баритом или с известковой водой. Колбу с бродящей жидкостью помещают в водяную баню на плитке, где поддерживается температура 35–40 °С с периодическим подогреванием. Через несколько минут после установки в пробирку с баритом начинают поступать пузырьки газа, со временем ток их становится равномерным. Баритовая вода начинает интенсивно мутнеть. Следят за выделением пузырьков и помутнением жидкости.

ЗАНЯТИЕ 8

Тема: «Виды брожений. Уксуснокислое брожение».

Цель: знакомство с химизмом процесса брожения, морфологией микроорганизмов.

Материалы и оборудование: кислое пиво, чайный гриб, 10-процентный р-р соды, 10-процентный р-р хлорного железа (FeCl_3), р-р йода, р-р люголя, фуксин, спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги, предметные стекла, спиртовки.

ХОД РАБОТЫ

1. Рассмотреть и описать микроорганизмы, зарисовать их с живых и фиксированных препаратов. Живые препараты приготовить методом раздавленной капли и висячей капли из пленки и р-ра чайного гриба, кислого пива, подкрасить р-ром йода, люголя. Мазки окрасить по Граму.

2. Сделать качественную реакцию на уксусную кислоту.

Процесс уксуснокислого брожения вызывается группой бактерий, являющихся облигатными аэробами. Они окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды в строго аэробных условиях:



При этом выделяется значительное количество энергии. Различные продукты, содержащие алкоголь (спирт, вино, пиво), являются благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих сюда из воздуха.

Эти бактерии встречаются повсеместно в природе, пыли, на фруктах, овощах. Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. На поверхности растворов бактерии образуют пленки, состоящие из полисахаридов. Типовой вид

Acetobacter aceti представлен слабоподвижными палочковидными эллиптическими клетками, одиночными, в парах или цепочках с размерами 0,6–0,8 x 1,0–3,0 мкм.

Это бесспорные грамотрицательные палочки, облигатные аэробы, они растут и размножаются на поверхности питательных сред, образуя тонкие пленки. Нередко образуют инволюционные формы в виде раздутых, разветвленных или нитевидных образований. *Acetobacter aceti* образует гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода. Палочка активно развивается при температуре около 34 °С, выносит концентрацию уксусной кислоты до 6 %. *Acetobacter xylinum* образует в культуре грубую, морщинистую, слизистую пленку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии живут в пленке чайного гриба, в сообществе с дрожжами. Такой симбиоз взаимовыгоден: дрожжи сбраживают сахар до спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

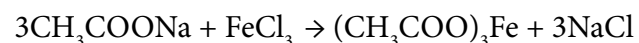
Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологически близка к *Ac. aceti*. Развивается на алкогольных напитках [1, 4, 9, 12].

Проведение качественной реакции на уксусную кислоту

Закладка опыта: за неделю-полторы до занятия в конические колбы наливают тонкий слой пива (1 см). Толщина слоя пива имеет большое значение для исхода опыта, так как для уксуснокислых бактерий должны быть созданы аэробные условия. К пиву добавляют немного (0,5 мл) спирта. Колбы закрывают ватными тампонами и ставят в термостат при температуре 30–35 °С на несколько суток.

Содержимое колб анализируют, описывают характер образовавшихся пленок, микроскопируют окрашенные мазки, делают качественную реакцию на CH_3COOH . Для этого к

5 мл скисшего пива в пробирку добавляют 2 мл 10-процентного р-ра соды и немного хлорного железа (3) той же концентрации. Смесь нагревают. При наличии уксусной кислоты появляется красное окрашивание вследствие образования ацетата железа:



ЗАНЯТИЕ 9

Тема: «Виды брожений. Маслянокислое брожение».

Цель: познакомиться с морфологией, химизмом, качественными реакциями маслянокислого брожения.

Материалы и оборудование: 5-процентный р-р FeCl_3 , 95-процентный этиловый спирт, концентрированная серная кислота, фуксин, р-р люголя, предметные стекла, спиртовки, культура картофельной палочки.

ХОД РАБОТЫ

1. Знакомство с закладкой опыта культуры маслянокислых бактерий, химизмом процесса брожения.

2. Приготовить препараты маслянокислых бактерий методами раздавленной капли и мазка.

3. Выполнить качественные реакции на масляную кислоту.

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой анаэробных спороносных бактерий. Химизм этого процесса сложен и до настоящего времени недостаточно выяснен. Схематично процесс можно выразить следующим образом:



Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий. Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений. Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода *Clostridium*. За неделю-полторы до занятия закладывают опыт. Для этого неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками, которыми заполняют пробирку на 1/3 объема, добавляют щепотку мела и заполняют водой почти доверху. Пробирки по-

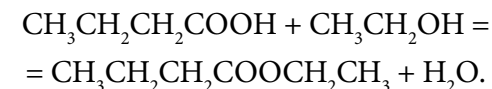
мешают в водяную баню при температуре 80 °С на 10–15 мин., затем закрывают пробками и ставят в термостат с температурой 35 °С. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспорные формы других видов, убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

Другой способ получения культуры маслянокислых бактерий: 5 г ячменя (солода), 2 г мела, 5 г сахара – все заливают водой (100 мл) и кипятят в течение 5 мин. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, на дно которой бросают кусочек почвы или семени гороха. Пробирку держат в термостате при 30–35 °С семь дней. На следующем занятии производят микроскопирование жидкости, в которой обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры.

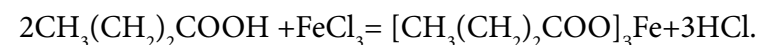
Clostridium pasteurianum – свободноживущий анаэробный азотфиксатор, обитающий в почве. В клетках этих бактерий содержится гранулеза, которая окрашивается р-ром люголя в синий цвет. Ее можно видеть при микроскопировании живых бактерий в капле суспензии культуральной жидкости с добавкой реактива методом раздавленной капли с масляной иммерсией. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой. С культуральной жидкостью проводят качественные реакции на масляную кислоту [1, 4, 12].

Качественные реакции

1. К 3–4 мл жидкости в пробирку добавляют 0,5 мл 95-процентного спирта и одну-две капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этилового эфира, напоминающий запах ананаса:



2. К 5 мл исследуемой жидкости добавить 2 мл 5-процентного FeCl_3 . При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета:



Контрольные вопросы по теме «Виды брожений»

1. Какие условия необходимы для протекания каждого из видов брожения: спиртового, маслянокислого, молочнокислого, уксуснокислого? Назовите ферменты процессов брожения.

2. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое брожение? Чем отличается гомоферментативный процесс от гетероферментативного? Назовите культурные расы дрожжей, вызывающих спиртовое брожение.

3. В чем особенности жизнедеятельности чайного гриба?

4. Каким способом можно обнаружить молочную кислоту?

5. Как можно получить культуру маслянокислых бактерий? Каковы особенности бактерий рода *Clostridium*?

6. Какие качественные реакции существуют для обнаружения масляной кислоты в культуральной среде?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эпоху протерозоя микроорганизмы были единственными обитателями Земли. Современный уровень наших знаний позволяет констатировать, что именно микроорганизмам принадлежит ведущая роль в процессах круговорота биогенных элементов (углерода, азота, фосфора, серы и др.) в природе, определяющих возможность жизни на Земле. Осуществляя процессы минерализации веществ органического опада, они возвращают в атмосферу углекислый газ, столь необходимый для процесса фотосинтеза, а также переводят в минеральную форму, доступную для усвоения растениями, такие жизненно важные элементы, как азот, фосфор, сера и др.

Микроорганизмы выполняют благородную роль санитаров планеты, освобождая окружающую среду от токсичных соединений, таких, как аммиак, сероводород, метан, угарный газ и др. Денитрифицирующие бактерии являются единственными продуцентами оксидов азота и играют важную роль в поддержании озонового экрана, защищающего все живые организмы планеты от интенсивного воздействия солнечной радиации.

Исследования, проведенные за последнее время, свидетельствуют о непосредственном участии микроорганизмов в геохимических процессах, формировании месторождений нефти, меди, марганца, железа, серы и фосфоритов.

Активная жизнедеятельность микробного населения определяет плодородие почв и, следовательно, служит основой нашего земледелия. Достаточно сказать, что основная масса запасов азота (не менее 65–70 %) в почве пополняется биологическим путем за счет фиксации молекулярного азота атмосферы свободноживущими и симбиотическими формами микроорганизмов.

Высокий уровень метаболизма, уникальная скорость размножения при относительно простой структурной органи-

зации сделали прокариот излюбленной моделью в экспериментах по биохимии, генетике и молекулярной биологии.

После открытий Луи Пастера во второй половине XIX века – установивших суть процессов брожения и самих агентов-представителей, их вызывающих, начался качественно новый физиологический период в микробиологии, который послужил и дальнейшему развитию биотехнологии.

Таким образом, области жизнедеятельности микроорганизмов, их роль в природе и возможности использования в различных отраслях народного хозяйства трудно оценить.

Выражаем надежду, что предлагаемое руководство может быть полезным не только студентам вузов, но и других учебных заведений, а также специалистам смежных областей, которым приходится работать с микроорганизмами.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Аникеев, В. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / В. В. Аникеев, К. А. Лукомская. – М.: Просвещение, 1983. – 128 с.
2. Асонов, Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М.: ВО Агропромиздат, 1989. – 230 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение; пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988. – 480 с.
4. Васильева, З. В. Лабораторные работы по микробиологии / З. В. Васильева, Г. А. Кириллова, А. С. Ласкина. – М.: Просвещение, 1979. – 80 с.
5. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология: учеб. пособие / Л. И. Воробьева. – М.: изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
6. Громов, Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л.: изд-во ЛГУ, 1989. – 124 с.
7. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: МГУ, 1985. – 340 с.
8. Де Дюв, К. Путешествие в мир живой клетки / К. Де Дюв. – М.: Мир, 1987. – 256 с.
9. Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1989. – 448 с.
10. Жданов, В. М. Занимательная микробиология / В. М. Жданов. – М.: Знание, 1967. – 258 с.
11. Заварзин, Г. А. Микробиология XXI века / Г. А. Заварзин. – М.: Знание, 1981. – Сер. «Биология», № 1.
12. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
13. Лукомская, К. А. Микробиология с основами вирусологии: учеб. пособие для студ. пед. ин-тов по биол. и хим. специальностям / К. А. Лукомская. – М.: Просвещение, 1987. – 192 с.
14. Майер, В. Невидимый мир вирусов / В. Майер, М. Кенда. – М.: Мир, 1981. – 175 с.

15. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы: учеб. пособие. – СПб.: изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2003. – 147 с.
16. Мишустин, Е. Н. Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. – М.: Колос, 1978. – 352 с.
17. Нетрусов, А. И. Общая микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: Академия, 2007. – 220 с.
18. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. – Т. 1 / Под ред. Дж. Хоула [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 432 с.: ил.
19. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. – Т. 2 / Под ред. Дж. Хоула [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 368 с.: ил.
20. Пяткин, К. Д. Микробиология / К. Д. Пяткин, Ю. С. Кривошеин. – М.: Медицина, 1981. – 286 с.
21. Чурбанова, И. Н. Микробиология: учебник для вузов / И. Н. Чурбанова. – М.: Высшая школа, 1987. – 239 с.
22. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель; пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Учебное издание

КАЛГАНОВА Татьяна Николаевна

**ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Лабораторные работы

**Корректор В. А. Яковлева
Верстка Е. Ю. Иосько**



Подписано в печать 16.05.2011. Бумага «SvetoCopy»
Гарнитура «Minion Pro». Формат 60х84^{1/16}
Тираж 500 экз. Объем 3,5 усл. п. л. Заказ № 661-11

Издательство Сахалинского государственного университета
693008, Южно-Сахалинск, ул. Ленина, 290, каб. 32
Тел. (4242) 45-23-16, тел./факс (4242) 45-23-17
E-mail: polygraph@sakhgu.sakhalin.ru