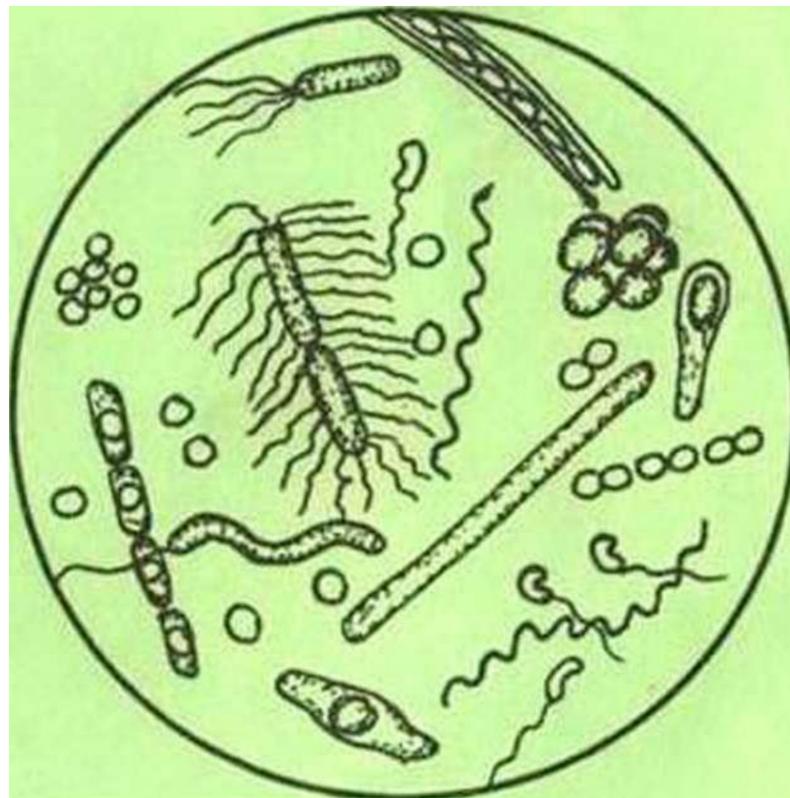


А.А. Сиротин

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ



ББК
28.4я73 Печатается по решению Редакционно-издательского
П 69 совета Белгородского государственного университета

А в т о р - с о с т а в и т е л ь

кандидат биологических наук, профессор кафедры ботаники и методики преподавания биологии *А.А. Сиротин*

Р е ц е н з е н т ы :

кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой медико-профилактических дисциплин *В И Евдокимов*

кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и методики преподавания биологии *Л В Ласарев*

Практикум по микробиологии / Авт.-сост. А.А. Сиротин. - Белгород:
Изд-во БелГУ, 2007. - 80 с.

Практикум написан в соответствии с рабочими программами курса (Микробиология» с целью помочь студентам, обучающимся на очном отделении по классической специальности 011600 - биология и педагогической специальности 032400 - биология-химия, а также студентам заочного отделения в выполнении лабораторных работ по данной дисциплине.

ББК 28.4я73

© Белгородский государственный университет, 2007

Учебное издание

Сиротин Александр Андреевич

ПРАКТИКУМ ПО
МИКРОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Тема 1. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.....6	
Занятие 1. Приготовление микроскопических препаратов. Работа с иммерсионным объективом	6
Тема 2. Морфология бактериальных клеток	9
Занятие 2. Основные формы бактерий. Шаровидные и палочковидные бактерии, извитые и нитчатые	9
Занятие 3. Запасные клеточные включения. Споры	15
Занятие 4. Методы дифференцированной окраски клеток бактерий. Обнаружение капсул.....	19
Тема 3. Анализ микрофлоры воздуха, воды и почвы.....	22
Занятие 5. Микробиологический анализ сред воздуха - методом осаждения. воды и почвы - методом разбавления.....	22
Тема 4. Превращения безазотистых органических веществ под влиянием микроорганизмов.....	29
Занятие 6. Выращивание культур микроорганизмов, вызывающих брожение и неполное окисление субстрата.....	29
Занятие 7. Знакомство с микроорганизмами, вызывающими брожение.....	32
Тема 5. Микробиологические процессы превращения азотистых веществ.....	42
Занятие 8. Выращивание микроорганизмов, участвующих в круговороте азота	42
Занятие 9. Изучение бактерий, участвующих в превращениях соединений азота.....	47
Тема 6. Фитопатогенные микроорганизмы.....	50
Занятие 10. Знакомство с некоторыми микроорганизмами-возбудителями болезней растений	50
Тема 7. Полезные микроорганизмы	57
Занятие 11. Методы изучения антагонизма у микроорганизме.....	57
Занятие 12. Микробиологический метод защиты растений	60
Тема 8. Основы иммунологии	63
Занятие 13. Изучение некоторых иммунологических реакций.....	63
Приложения.....	71
Приложение 1. Приготовление наиболее употребительных красок и реактивов	71
Приложение 2. Работа с микроскопическими препаратами.....	73
Приложение 3. Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов.	74
Приложение 4. Список латинских названий микроорганизмов... ..	75
Список использованной литературы.....	78

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее пособие служит дополнением к лекционному курсу «Микробиология с основами вирусологии» для студентов, обучающихся по классической специальности «биология» и педагогическим специальностям «биология с дополнительной специальностью «химия» и «биология» с дополнительной специальностью «экология», и представляет собой руководство к выполнению лабораторных работ, на которые рабочими программами отводится 40 часов.

Пособие призвано обеспечить практическую подготовку студентов по основным темам теоретического курса, углубление и закрепление знаний, выработку умений и навыков культивирования микроорганизмов, их микроскопического и физиологического исследования. Предполагается подготовка студентов к проведению практических занятий с микроорганизмами в школьном курсе биологии.

Приведенные в практикуме задания расположены в той же последовательности, что и соответствующий им учебный материал в программе и теоретическом лекционном курсе. Сначала идут задания по общей микробиологии (морфологии микроорганизмов), затем по физиологическим процессам и частным процессам превращения безазотистых, азотсодержащих и других веществ. Завершается лабораторный курс ознакомлением с фитопатогенными и полезными микроорганизмами, а также некоторыми сведениями по иммунологии. При определении очередности в изучении тем решающими факторами послужили логика усложнения заданий и необходимость заблаговременной постановки экспериментов по выращиванию определенных групп микроорганизмов.

Материал каждого занятия излагается в определенной последовательности: вначале кратко дается теория, потом перечень необходимого оборудования и объектов исследования, затем конкретное задание студенту и последовательность его выполнения, контрольные вопросы.

Объяснение к заданию имеет цель связать материал учебника и лекционного курса с содержанием конкретной темы лабораторного занятия и не заменяет студенту изучения теоретического курса, которое должно предшествовать выполнению лабораторной работы.

В задании определены объекты исследования и методы, при помощи которых студент может выполнить заданный объем работы. Вследствие дефицита времени, сжатости курса и длительности выращивания некоторых микроорганизмов часть работы выполняется сотрудниками кафедры, но методика работы кратко излагается. В конце каждой темы приводятся вопросы для самоконтроля, при помощи которых студенты могут определить степень своей подготовки.

Выполнение конкретных индивидуальных заданий контролируется преподавателем в течение занятия по мере их выполнения. Лучшие препараты рекомендуется просмотреть всем, а нетипичные с помощью преподавателя анализируются. И исследуются для выяснения причин, вызвавших отклонение от нормы.

Результаты экспериментов и микроскопирования препаратов заносятся в рабочую тетрадь каждым студентом, объект зарисовывается в укрупненном масштабе, делаются необходимые пояснительные подписи (объекты именуются по латыни), подводятся итоги занятия. Рабочая тетрадь служит основным источником практической подготовки студента к зачету или экзамену.

Тема 1. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Занятие 1. Приготовление микроскопических препаратов. Работа с иммерсионным объективом

План

1. Знакомство с иммерсионной системой микроскопа.
2. Приготовление микроскопического препарата бактерий (*Bac. subtilis*, *Proteus vulgaris* или *Bac. mesentericus*): а) метод раздавленной капли с прижизненной окраской микробов; б) метод висячей капли.
3. Фиксация и окраска препаратов бактерий. Изучение препарата при помощи иммерсионного объектива.

Материалы и оборудование

1. Чистые и накопительные культуры бактерий *Bac. subtilis*. *Bac. mesentericus*.
2. Чистые и накопительные культуры бактерий *Proteus vulgaris*.
3. Метиленовый синий.
4. Карболовый фуксин.
5. Нейтральный красный.
6. Иммерсионное масло.
7. Раствор Люголя.
8. Микроскоп.
9. Предметные и покровные стекла.
10. Предметное стекло с вышлифованным углублением.
11. Препаровальные иглы и петли для пересева
12. Стеклянные палочки.
13. Спиртовка или газовая горелка.
14. Штативы для предметных стекол с лотками.
15. Марлевые салфетки

Основные сведения

Определенное представление о форме, размерах и движении микробной клетки можно получить, изучая ее прижизненно. Для прижизненного микроскопирования бактерий применяются методы раздавленной капли и висячей капли, описанные ниже. Однако клетки большинства микробов бесцветны и прозрачны, что затрудняет их изучение. Кроме того, часто показатель преломления цитоплазмы очень близок к показателю преломления жидкости, в которой она находится, и тогда микроорганизм становится практически невидимым в световом микроскопе. Поэтому микроорганизмы можно слегка подкрасить нейтральной краской. Такая окраска называется прижизненной.

Красители, которые применяют для прижизненной окраски клеток бактерий, называют *витальными*. Они бывают основными и кислотными в зависимости от того, где в молекуле красители стоит хромофорная (красящая) группа. Если она находится при анионе, то это кислотная краска (например,

индигокармин, кислотный фуксин), если при катионе - основная (нейтральный красный, метиленовый синий). Чаще применяется нейтральный красный. В слабой концентрации этого красителя бактериальные клетки могут расти и даже размножаться.

Для более детального изучения клеток микроорганизмов применяют фиксированные препараты. При фиксации микробы убивают и затем окрашивают.

Приготовление фиксированных препаратов складывается из следующих операций: приготовления мазка, высушивания препарата, его фиксации и окраски.

Для изучения микроорганизмов (как прижизненного, так и фиксированного препаратов) пользуются иммерсионной системой микроскопа; более контрастное и четкое изображение при этом достигается тем, что объектив микроскопа погружается в каплю иммерсионного масла.

Коэффициент преломления иммерсионного масла приблизительно равен коэффициенту преломления стекла, поэтому все лучи от источника света собираются в объективе. Это резко увеличивает освещенность и дает возможность более отчетливо видеть рассматриваемый объект. После работы с иммерсионным объективом следует тщательно протереть его марлевой салфеткой, сначала смоченной в бензине, а затем сухой.

Для знакомства с методами микроскопического исследования микроорганизмов удобно использовать бактерии *Proteus vulgaris* или *Bac. subtilis*.

Proteus vulgaris (аммонификатор) относится к факультативным анаэробам, встречается в гниющем мясе, навозе. Этот микроорганизм в зависимости от условий и состава питательной среды может иметь разнообразную форму и размеры - от короткой палочки (1-3 мкм) до длинной, вытянутой, иногда изогнутой под прямым углом (19-20 мкм). Объект крупный, легко рассматривается в микроскопе.

Bac. subtilis, или сенная палочка, - аэроб-аммонификатор, легко выделяется из сенных настоев, имеет вид гонкой подвижной палочки размером 3-5х0,6 мкм. образует споры, клетки обычно соединены в длинные нити.

Bac. mesentericus (картофельная палочка) - аэроб-аммонификатор. морфологически сходен с предыдущим.

Ход работы

Метод раздавленной капли На середину чистого предметного стекла наносят каплю водопроводной воды, стерильной петлей добавляют в нее небольшое количество бактерий и хорошо размешивают.

Если исследуемые микроорганизмы выращены в жидкой питательной среде, то суспензию клеток микробов наносят с помощью стерильной пипетки.

Каплю сверху накрывают покровным стеклом, предварительно подкрасив ее красителем, и рассматривают при большом увеличении или с иммерсией. В этом случае на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла. Препарат помещают на столик микроскопа. Затем под контролем (смотрят на препарат сбоку) очень осторожно погружают иммерсионный объектив 90X в масло, а затем медленно при помощи микрометрического винта приподнимают объектив до появления в поле зрения изучаемого объекта. Дальнейшая фокусировка производится микрометрическим винтом. В поле зрения микроскопа можно видеть быстродвигающиеся палочковидные бактерии, а у спорообразующих бацилл - и овальные споры.

Метод висячей капли. Для получения висячей капли на чистое покровное стекло наносят каплю суспензии микробов, слегка подкрасив ее нейтральным красителем. Накладывают предметное стекло с углублением на покровное стекло так, чтобы капля оказалась в выемке, быстро переворачивают препарат. Капля, таким образом, окажется в висячем положении в закрытой камере. Препарат рассматривают при большом увеличении или с иммерсией, нанося каплю иммерсионного масла на покровное стекло. Метод висячей капли дает возможность наблюдать микробы длительное время и даже следить за делением и активным движением клеток.

Примененная окраска микробов. При работе с раздавленной каплей для лучшей видимости микробов жидкость можно слегка подкрасить, вводят под покровное стекло небольшую каплю раствора нейтральной красной или метиленовой сини. При этом бактерии окрасятся и будут отчетливее видны в поле зрения микроскопа. Препарат рассматривают при большом увеличении или с иммерсией.

Фиксированный препарат. Для того, чтобы его приготовить, выполняют следующие операции:

1. Приготовление мазка бактерий.
2. Высушивание.
3. Фиксацию.
4. Окраску.
5. Промывку.
6. Высушивание.
7. Нанесение иммерсионного масла (факультативно).

Работу начинают с приготовления мазка. На чистое предметное стекло в каплю водопроводной воды вносят небольшое количество культуры микроорганизмов, тщательно перемешивают и растирают ее с помощью петли концентрическими кругами, распределяя мазок по поверхности стекла тонким слоем.

Затем препарат высушивают на воздухе при комнатной температуре, для ускорения процесса можно подсушивать препарат высоко над пламенем горелки. Высушивание надо проводить очень осторожно, не допуская перегрева мазка, так как при этом может произойти быстрое свертывание белков протоплазмы бактериальной клетки, что нарушит ее структуру.

После высушивания препарат фиксируют. Для этого высушенный мазок несколько раз быстро проводят через пламя горелки. Фиксация ставит своей

целью убить микроорганизмы, обеспечить лучике прикрепление мазка к стеклу, сделать мазок более восприимчивым к краске.

После фиксации приступают к окраске. Фиксированный мазок на 1-2 мин. покрывают раствором метиленового синего или карболового фуксина. Избыток краски тщательно смывают струей воды до полного обесцвечивания стекающих капель. После окраски препарат высушивают над пламенем горелки и рассматривают с иммерсионным объективом. Для этого на фиксированный окрашенный и хорошо высушенный охлажденный мазок наносят каплю иммерсионного масла (покровным стеклом накрывать не надо).

К отчету о работе прилагаются рисунки изучаемых бактерий, латинские названия их и краткое описание формы и движения клеток.

Контрольные вопросы

1. Перечислите способы приготовления микроскопических препаратов.
2. Как можно приготовить препарат для наблюдения живых клеток бактерий под микроскопом?
3. С какой целью применяется фиксация при приготовлении препаратов бактериальных клеток?
4. Какие красители называются витальными, или прижизненными?
5. Какие красители называются кислотными, а какие основными?

Тема 2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Занятие 2 Основные формы бактерий. Шаровидные и палочковидные бактерии, извитые и нитчатые

План

Микроскопическое исследование различных форм бактерий.

1. Шаровидные:
 - а) кокки - *Micrococcus aurantiacus*, *Streptococcus lactis*;
 - б) сарцины - *Sarcina ureae*, *Sarcina flava*.
2. Палочковидные:
 - а) бактерии - *Achromobacter stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*,
 - б) бациллы - *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*.
3. Извитые
 - а) вибрионы - *Vibrio buccalis*;
 - б) спирохеты - *Spirochacta buccalis*.
4. Нитчатые: *Crenothrix polyspora*.

Материалы и оборудование

1. Чистые или накопительные культуры исследуемых бактерий.
2. Колонии бактерий посева из воздуха на МПА.

3. Фуксии.
4. Метиленовый синий.
5. Микроскоп.
6. Иммерсионное масло.
7. Предметные и покровные стекла
8. Препаровальные иглы.
9. Иглы для пересева.
10. Марлевые салфетки.
11. Спиртовка или газовая горелка
12. Штативы для предметных стекол и лотки.

Основные сведения

Бактерии по своей форме делятся на четыре группы: шаровидные, палочковидные, извитые и нитчатые.

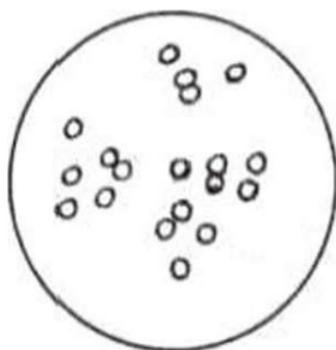


Рис. 1. *Micrococcus aurantiacus*

Шаровидные бактерии - кокки - имеют округлые клетки. Одиночные кокки носят название монококков (или микрококков). Часто после деления такие клетки не расходятся, а образуют группы (рис.1). Группа из двух кокков образует диплококк. Если деление происходит все время в одном направлении и образующиеся клетки не разъединяются, получается нить из отдельных шариков в виде цепи; эта форма носит название стрептококка. При делении в

двух взаимно перпендикулярных направлениях возникает группа, состоящая из четырех кокков. - тетракокк. Если деление происходит в трех взаимно перпендикулярных направлениях

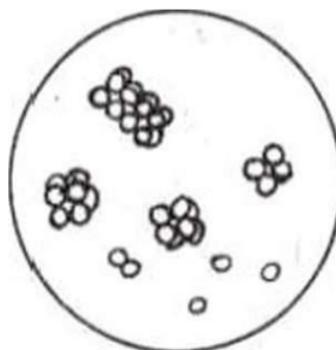


Рис 2. *Sarcina flava*. Правильные пакеты по 8-16 «леток

и клетки не расходятся, то образуется скопление клеток в виде пакетов (кубиков) - сарцины (рис. 2). Делясь в разных плоскостях и направлениях без особой закономерности, кокки образуют беспорядочное скопление клеток, напоминающее виноградные гроздья, это стафилококки.

Бактерии *палочковидной* формы составляют наиболее многочисленную группу (рис. 3-7). В классификации палочковидных форм те, которые могут образовывать споры, принято именовать бациллами; палочковидные формы, не способные к спорообразованию, называют бактериями (в узком смысле этого слова). Но взаимному расположению клеток среди палочковидных бактерий различают также одиночные бактерии, диплобактерии, стрептобактерии (или бациллы). ^

В клетке бациллы обычно образуется спора. Расположение споры может быть центральным и терминальным (на конце клетки). Некоторые бациллы, содержащие споры, не изменяют формы клетки (бациллярный тип спорообразования), другие при спорообразовании изменяют ее. Одни приобретают вид барабанной палочки - это так называемая плектридная форма, свойственная, например, *Granulobacter pasteurianus*. Другие принимают форму веретена это клостридийная форма, характерная для *Clostridium pasteurianum*.



Многие палочковидные бактерии подвижны. Движение обеспечивается жгутиками у эубактерий (рис. 3. 6), пурпурных бактерий, а также у микробов некоторых других групп в определенной стадии развития (подвижная стадия).

Величина бактериальных клеток, как правило, очень мало и измеряется микрометрами (микронами). Кокки имеют размеры около 1-2 мкм в диаметре, бактерии в длину достигают в среднем 1-8 мкм, однако встречаются и более крупные - до 50 мкм (*Beggiatoa mirabilis*).

Такие микробы, как риккетсия, имеют размеры еще меньше, чем кокки (1-2 мкм в длину, 0.3-0,7 мкм - в поперечнике). А вирусы и фаги - еще мельче и видны лишь в электронный микроскоп.

Для знакомства с бактериями, которые имеют форму кокков, можно использовать перечисленные далее микроорганизмы. *Micrococcus aurantiacus* (рис. 1) имеет одиночные клетки, иногда в парах и небольших цепочках. Колонии красно-оранжевого или оранжевого цвета. Микроб усваивает минеральный азот, хорошо растет в синтетических и органических средах, расщепляет сахара. Встречается в почве, воде, воздухе. *Sarcina ureae* имеет клетки средних размеров (2-6 мкм). Колонии этого микроба достигают 4-5 мм в диаметре, окрашены в желтый или оранжевый цвет. *S. ureae* - аэроб разлагает мочевины и белок.

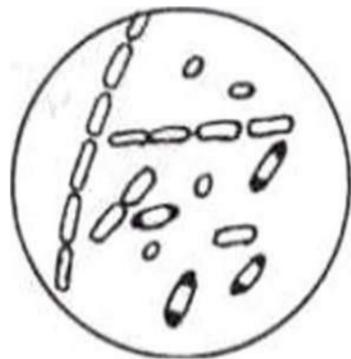


Рис 4 *Bacillus mesentericus* Вегетативные клетки и споры.

Встречается и почве, в воздухе. *Escherichia coli* - кишечная палочка (рис. 6) имеет вид небольшой палочки (2-3 мкм). не образует спор; бактерия относится к группе аммонификаторов. *Bac. subtilis* (сенная палочка) - аэроб, аммонификатор. спороносная короткая палочка, перитрих (рис. 3). В присутствии пептона и углеводов образует ацетон, уксусный альдегид, масляную кислоту. *Bac. mesentericus* - небольшая (1.5-5 мкм) спороносная палочка. аэроб, аммонификатор (рис. 4). Встречается на гниющих продуктах. *Bac. tyroideus* - небольшая палочка (1.6-3.6 мкм). образующая в центре клетки овальные споры разной величины (рис 5). На твердых питательных средах образует характерные колонии, напоминающие грибной мицелий (отсюда и название: *tyroideus* - грибоподобный). аммонификатор. аэроб.

Извитые формы бактерий делятся на три группы: вибрионы, спириллы и спирохеты. Все они обладают подвижностью.

В и б р и о н ы - не гнутся при движении формы; клетка представляет собой как бы часть витка спирали, по форме она слегка напоминает запятую (рис. 8).

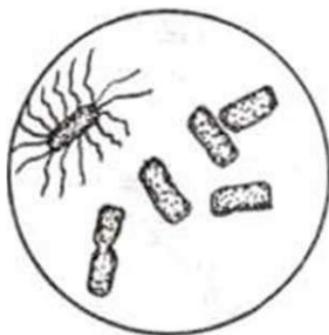


Рис. 6. *Escherichia coli* (кишечная палочка). Перитрих. беспоровая бактерия

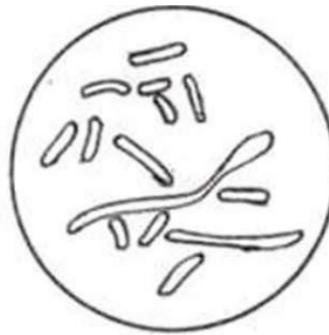


Рис. 7. *Protus vulgaris* Видны клетки различной длины (6-40 мкм).

С п и р и л л ы - н е гнущиеся при движении формы, клетка имеет один или большее число витков спирали (рис. 9).

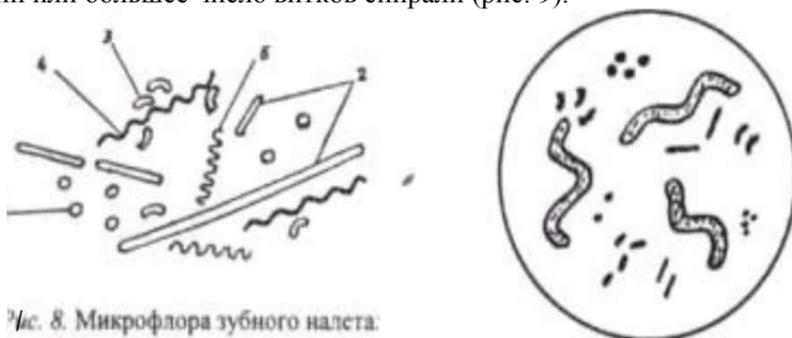


Рис. 8. Микрофлора зубного налета.

1. - Streptococcus albus. 2 - Bac. maximus buccali. 3 - Vibrio buccalis. 4 - Spirochaeta buccalis. 5 - Spirochaeta dentium

Способность к движению у этих бактерий обуславливается наличием жгутиков. Характер движения зависит от положения жгутиков на поверхности клетки

К спириллам относится пурпурная фототрофная бактерия Rhodospirillum rubrum. Этот вид характеризуется полярным жгутикованием, а также наличием в хроматофорах пурпурного пигмента родопсина и бактериохлорофиллов. Однако под микроскопом в живом состоянии одиночные клетки Rhodospirillum rubrum выглядят серыми и лишь в результате скопления большого количества бактериальных клеток культуральная жидкость бывает окрашена в пурпурный цвет (рис. 8.9).

С п и р о х е т ы - это особая группа прокариотических одноклеточных организмов. Оболочка клеток, в отличие от других бактерий, слабо ригидная, поэтому тело спирохеты способно при движении змеевидно изгибаться.

Во внутренней структуре клеток спирохет также имеется ряд отличительных черт: например, наличие аксиальной цитоплазматической нити, расположенной вдоль всего тела бактерии.

Выделяют спирохеты безвредные для человека, это, например, обитатели ротовой полости (Spirochaeta buccalis), и патогенные, которые встречаются в почве, водоемах и организмах человека и животных (Treponema pallidum).

Нитчатые бактерии Это длинные, иногда ветвящиеся нити, включающие большое количество клеток, заключенных в трубчатое влагалище (рис. 10). Осуществляют процессы окисления соединений серы, железа, например, Beggiatoa mirabilis (ползающая бактерия), Crenothrix polyspora - железобактерия, прикрепленная к субстрату.

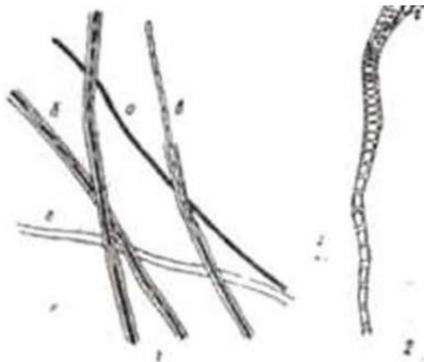


Рис 10 Нитчатые формы железобактерий I
 1 Leptothrix ochracea а - несептированная
 нить протоплазмы без влагалища, б -
 влагалище с клетками внутри, в -нить,
 выползающая из влагалища.. г - старое
 влагалище. 2 - Sphaerothrix polyspora. нити
 с микро- и макроконидиями. 3 -
 Gallionella ferruginea. различные формы
 нитевидных стебельков

Ход работы

На четырех чистых предметных стеклах готовят фиксированные и окрашенные фуксином или метиленовым синим препараты культур: *Bac. subtilis*. *Micrococcus aurantiacus*. *Bac. mesentericus*. *Sarcina flava*.

Если для приготовления препаратов используют чистые культуры микроорганизмов, то следует соблюдать условия стерильности.

Фиксированные, окрашенные и промытые препараты подсушивают и рассматривают без покровного стекла с иммерсионной системой. При рассмотрении бактерий нужно обратить внимание на форму и размеры клеток. Бактерии зарисовывают и подписывают их названия.

Микроскопическое исследование зубного налета. На предметное стекло наносят каплю воды, затем спичкой или зубочисткой берут немного зубного налета, смешивают с каплей воды, приготавливают мазок, фиксируют и окрашивают фуксином. Промытый и высушенный препарат рассматривают с иммерсионным объективом В препарате (рис. 8) видны различные формы бактерий: *Streptococcus albus*. *Bac. maxims buccalis* и другие. иногда случайные виды.

Bac. maxims buccalis - аэроб, имеет форму длинных довольно толстых нитей. Дает колонии желтого, бледно-желтого или золотистого цвета.

Spirochaeta buccalis аэроб, клетки имеют вид длинных, довольно крупных спирально закрученных нитей.

Spirochaeta dentium - также спирально закрученная нить, однако более тонкая, чем *S. buccalis*.

Vibrio buccalis - мелкие клетки полукруглой формы, монотрих. как и все предыдущие виды, представитель нормальной микрофлоры ротовой полости.

Микроскопическое исследование навозного настоя На предметное стекло наносит каплю навозного настоя, накрывают стеклом и рассматривают в живом состоянии при большом увеличении микроскопа с прикрытой диафрагмой (рис. 9). В препарате, в иды различные формы бактерий (вибрионы, спириллы, спирохеты). Движение бактерий отчетливо видно при рассмотрении их в висячей капле.

Микроскопическое исследование Crenothrix polyspora На предметное стекло наносят каплю культуральной жидкости *Crenothrix polyspora*, накрывают покровным стеклом и рассматривают при большом увеличении (рис. 10).

Контрольные вопросы

1. На какие четыре основные группы делят бактерии по их форме⁰
2. Как отличить сарцины от стафилококков по их внешнему виду?
3. В чем различие между бактериями (в узком смысле) и бациллами?
4. Как отличить клостридиальную форму бацилл от плектридиальной?
5. Опишите характерные особенности извитых форм бактерий (вибрионов, спирилл, спирохет).
6. Какие микроорганизмы вы обнаружили в зубном налете?

Занятие 3 Запасные клеточные включения. Споры

План

1. Обнаружение запасных клеточных включений:
 - а) волютина - в клетках *Saccharomyces cerevisiae*;
 - б) гранулезы - в клетках *Clostridium amylobacter*.
 - в) гликогена - в клетках *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*;
 - г) жира - в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, *Azotobacter chroococcum*.
2. Окраска спор по методу Циля или Пешкова у *Bac. subtilis*, *Clostridium pasteurianum*

Материалы и оборудование

1. Чистые культуры: *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Clostridium amylobacter*, *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum*, *Saccharomyces cerevisiae*
2. Растворы Люголя для окраски гранулезы и гликогена (0,4 и 7 % р-ры I).
3. Раствор краски судан Ш
4. 5-процентный раствор хромовой кислоты
5. 0,5-процентный раствор нейтрального красного
6. Карболовый фуксин Циля.
7. 5-процентный и 1-процентный растворы серной кислоты.
8. Метиленовый синий.
9. Иммерсионное масло.
10. Микроскопы.
11. Покровные и предметные стекла.
12. Иглы и петли для пересева
13. Препаровальные иглы.
14. Стеклянные палочки.
15. Спиртовка или газовая горелка.
16. Фильтровальная бумага.
17. Штативы для предметных стекол.
18. Лотки.

Основные сведения

В результате жизнедеятельности в клетках микроорганизмов образуются запасные включения. Сюда относятся волютин, гранулеза, гликоген, жир и другие соединения.

Волютин - запасное вещество, состоящее из неорганических веществ (полифосфатов и полиметафосфатов) и соединений, близких к нуклеиновым кислотам. Откладывается в виде гранул у бактерий в цитоплазме клеток, а у дрожжей - в вакуолях. Эти гранулы являются резервом фосфатов, за счет которых в клетках синтезируются молекулы нуклеиновых кислот, АДФ и АТФ. Волютин накапливается при выращивании бактерий в условиях хорошего питания (на глицерине с добавлением солей фосфорной кислоты). Метиленовый синий окрашивает волютин в фиолетово-красный цвет. Поэтому существует другое название волютина - метахроматические гранулы (метахромазия - свойство окрашиваться в цвет, отличный от цвета окрашивающего вещества).

Гранулеза - крахмалоподобное вещество, которое при гидролизе дает D-глюкозу. Гранулеза хорошо обнаруживается у маслянокислых бактерий, например, у *Clostridium pasteurianum*.

Клетки бывают почти целиком заполнены мелкими гранулами этого вещества. Эта бактерия образует споры клостридиальной формы. В процессе жизнедеятельности осуществляет маслянокислое брожение, фиксирует молекулярный азот.

Гликоген - крахмалоподобное вещество, имеет зернистую структуру, иногда же находится в цитоплазме клетки в растворенном состоянии. Гликоген широко распространен у различных микроорганизмов: *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжей), *Bac subtilis* (сенной палочки), *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*.

Жир как включение встречается в клетках многих микроорганизмов, его можно обнаружить в старых культурах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

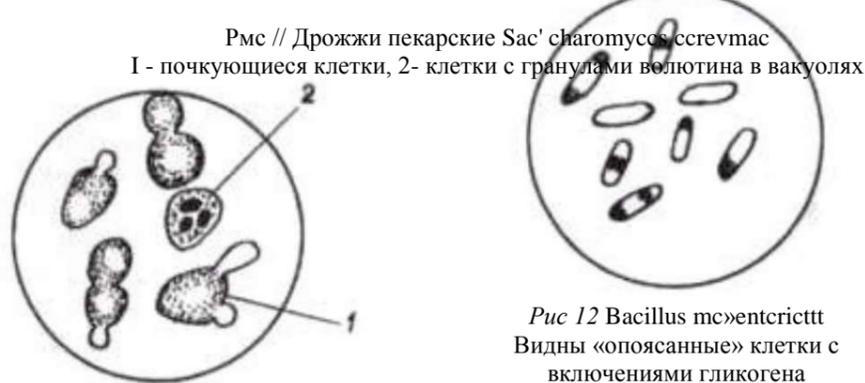
Споры бактерии образуются при неблагоприятных условиях. Они возникают внутри бактериальной клетки и обычно имеют сферическую или овальную форму. Спора окружена толстой оболочкой, которая предохраняет ее содержимое от высыхания. Оболочка устойчива к действию большинства химических веществ, поэтому плохо окрашивается. Чтобы споры прокрасились, требуется специальная обработка препарата. Его обрабатывают (протравливают) кислотой, затем красят концентрированным раствором красителя при высокой температуре. При этом оболочки спор так прочно адсорбируют краску, что не обесцвечиваются при последующей обработке слабым раствором кислоты.

Таким образом, окраска спор производится по следующему принципу: протравливают фиксированный препарат кислотой, затем сильно прокрашивают его, вновь обрабатывают кислотой, обесцвечивая вегетативные тела бактерий и оставляя окрашенными споры, и, наконец, окрашивают вегетативные клетки в дополнительный контрастный цвет.

Ход работы

Обнаружение включений. Для обнаружения волютин на предметном стекле в каплю воды добавляют исследуемые микроорганизмы *Saccharomyces cerevisiae*. делают мазок, фиксируют его и окрашивают метиленовым синим. Волютиновые зерна приобретают фиолетовый или фиолетово-красный цвет, а протоплазма клеток окрашивается в голубой (рис. 11).

Для обнаружения гранулы на предметном стекле наносят взвесь бактерий *Clostridium amylobacter* и смешивают с каплей слабого раствора йода. Гранулы в бактериальных клетках окрашиваются йодом в темно-синий цвет.



Для обнаружения гликогена пользуются более концентрированным раствором йода. На предметное стекло наносят взвесь бактерий *Bac. subtilis* или другого микроорганизма и смешивают эту каплю с раствором йода. Гликоген окрашивается* в красно-бурый цвет (рис 12).

Для обнаружения жира в приготовленную на предметном стекле каплю суспензии исследуемых микроорганизмов *Azotobacter chroococcum* или *Saccharomyces cerevisiae* наносят каплю Судана III. Протоплазма клетки остается бесцветной, капли жира окрашиваются в оранжево-красный, а жиропробные вещества - в желтый цвет.

Окраска спор по методу Циля-Нильсона с модификации Мухачера
Мазок из культуры *Bac. subtilis*, *Clostridium pasteurianum*, *Bac. putrificus* или другой спороносной бактерии подсушивают на предметном стекле, фиксируют и наносят на него 5-процентный раствор хромовой (или серной) кислоты в качестве протравы. Препарат подогревают пять минут (до появления паров), затем сливают кислоту. После этого мазок промывают водой, покрывают фильтровальной бумагой и наносят на бумагу карболовый фуксин Циля (окраска через фильтровальную бумагу). Красят препарат в течение семи минут, периодически добавляя раствор красителя и подогревая его до появления пара *turn* даже доводя до кипения. По мере испарения растворителя добавляют краситель, не давая ему подсохнуть во время подогревания. Затем снимают фильтровальную бумагу, препарат промывают водой и обесцвечивают (в течение 15 сек.) 1-процентным раствором серной кислоты (быстро погружают в стаканчик или в ванночку с кислотой или наносят кислоту на препарат), после чего промывают водой. Потом окрашивают препарат метиленовым синим в течение 1 мин. (окрашиваются вегетативные клетки, обесцвеченные от фуксина кислотой). Затем препарат тщательно промывают водой, подсушивают и рассматривают с иммерсией.

Споры окрашиваются фуксином в ярко-красный цвет, а вегетативные клетки метиленовым синим - в синий.

Окраска спор по методу Пешикова
На предметном стекле готовят мазок из культуры бацилл, высушивают и фиксируют его в пламени горелки. На мазок наливают раствор метиленового синего и, подогревая стекло, доводят его до кипения. Прогревают препарат 20 сек., затем промывают водой и докрашивают мазок 0.5-процентным раствором нейтрального красного или эозина в течение 30 сек. Снова промывают препарат, высушивают и рассматривают с иммерсионной системой. При этом бактериальная клетка окрашивается в красный цвет, а спора - в синий.

К отчету о выполненной работе прилагаются зарисовки всех рассмотренных препаратов

Контрольные вопросы

1. Какие запасные включения можно обнаружить в клетках микроорганизмов?
2. Как формируются в метках бацилл споры, каково их строение и биологическое значение?
3. Опишите методы окрашивания спор в клетках микробов

Занятие 4. Методы дифференцированной окраски клеток бактерий. Обнаружение капсул

План

1. Окраска бактерий по Граму.
2. Обнаружение капсул у *A/otobacter chroococcum* и их окраска.

Материалы и оборудование

1. Чистые культуры *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp., *Chromobacter denitrificans* и других микроорганизмов.
2. Свежесделанный раствор карболового фуксина Цидя (1:10).
3. Карболовый генциановый фиолетовый.
4. %-процентный этиловый спирт
5. Иммерсионное масло.
6. Разбавленная тушь (1 часть туши и 10 частей воды) или раствор нигрозина
7. Микроскоп.
8. Предметные и покровные стекла
9. Иглы и петли для посева.
10. Препаровальные иглы.
11. Стеклянные палочки.
12. Фильтровальная бумага
13. Спиртовка или газовая горелка.
14. Штатив для предметных стекол.
15. Лотки.

Основные сведения

Окраска бактерий по Граму Способ окраски по Граму является необходимым диагностическим методом в микробиологической практике. Сущность дифференцированной окраски по Граму состоит в том, что краски трифенилметанового ряда, например, генциановый фиолетовый и йод образуют в клетках некоторых бактерий окрашенные соединения, которые не обесцвечиваются при последующей обработке препарата спиртом и сохраняют сине-фиолетовую окраску (грамположительные). Другие бактерии не обладают свойством удерживать краску и при обработке спиртом обесцвечиваются (грамотрицательные).

Это настолько универсальный способ сложной окраски, что все бактерии по этому показателю делятся на две группы: красящиеся по Граму - грамположительные (грамположительные) - и не красящиеся - грамотрицательные (грамнегативные). Отношение к окраске по Граму служит одним из основных морфологических признаков бактерий в их характеристике.

Способность бактериальных клеток окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и структуры клеточных стенок. У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит в основном из муреина (до 95 %) и тейхоевой кислоты. В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входят липопроотеиды, липосахариды, фосфолипиды и незначительное количество муреина (5 %). Отношение микроорганизмов к окрашиванию по Граму лучше проявляется у бактерий в молодых 2-3-дневных культурах.

Капсулы бактерий Многие микроорганизмы, в том числе и бакгерин, выделяют большое количество слизистых веществ. Впитывая в себя воду, эти вещества набухают и превращаются в клейкую студенистую массу, которая образует вокруг клеток слизистые чехлы, получившие название капсул. Химический состав капсулы у разных видов бактерий различен. Обычно капсулы состоят из полисахаридов (*Micrococcus aurantiacus*, *Leuconostoc mesenteroides*). Иногда капсулы содержат гликопротеиды и полипептиды (*Azobacter chroococcum*).

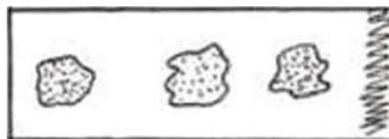
Образование капсул зависит от условий культуры и от особенностей питания бактерий. К числу микроорганизмов, образующих капсулы, относят вышеназванные организмы, а также некоторые патогенные бактерии (например, пневмококк, палочку сибирской язвы и др.).

О наличии капсул можно судить по характерному расположению клеток, так как в этом случае клетки, окруженные капсулами, не соприкасаются друг с другом.

Для выявления капсул применяют метод микроскопирования бактерий в капле туши или нигрозина. Преимущество этого метода состоит в том, что во влажной среде можно рассматривать бактерии в живом состоянии.

Рис 13 Приготовление трех

Можно также рассматривать в капле туши фиксированных препаратов на предварительно окрашенные бактерии (негативная окраска по Омелянскому).



одном предметном стекле для окраски по граму. Справа ориентирующая метка.

Ход работы

Окраска по Граму На одном предметном стекле поочередно готовят и фиксируют три мазка (рис. 13). В центре - мазок исследуемого микроорганизма, а справа и слева - контрольных: *Nitrosomonas* sp. (грамотрицательный) и *Bac. tuscoides* (грамположительный). На фиксированные мазки кладут полоску фильтровальной бумаги и наносят сверху краситель (генциановый фиолетовый). Через 1-2 мин. снимают бумажку и, не промывая мазок водой, наносят на препарат раствор йода (мазок чернеет).

Через 1 мин. действуют на маток 96-процентным спиртом: наливают спирт на предметное стекло или погружают стекло в спирт на 1 мин., затем промывают препарат водой. После промывания дополнительно окрашивают мазок раствором фуксина, через 0,5 мин препарат промывают водой и высушивают над спиртовкой.

Готовый препарат исследуют под микроскопом с иммерсионной системой. Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные в розовый.

Почти все патогенные кокки являются неположительными, среди палочковидных бактерий встречаются как грамположительные, так и грамотрицательные. Большинство спорогенных бацилл окрашиваются по Граму положительно.

Обнаружение капсул Для обнаружения капсул из чистой культуры *Azotobacter chroococcum* или *Vac. megaterium* готовят суспензию. Каплю суспензии помешают на предметное стекло, смешивают с каплей черной туши, покрывают покровным стеклом и рассматривают с иммерсионным объективом. На темном фоне препарата отчетливо видны неокрашенные крупные клетки *Azotobacter chroococcum*, а также заметна граница между капсулой и клеткой бактерий (рис. 14).

Для получения негативной окраски капсул по Омелянскому каплю суспензии *Azotobacter chroococcum* сначала смешивают на предметном стекле с каплей раствора краски (карболового фуксина или генцианового фиолетового), выдерживают 2-3 мин., затем прибавляют каплю туши, снова хорошо размешивают, размазывают по стеклу и высушивают на воздухе.

Вместо туши можно использовать 10-процентный раствор нигрозина, который окрашивает общий фон в черный цвет.

Препарат рассматривают с иммерсией. В поле зрения микроскопа на черном фоне отчетливо видны окрашенные в розовый или



фиолетовый цвет

клетки бактерий, вокруг которых видны светлые неокрашенные капсулы в виде различной величины ободков

Рис 14 *Azotobacter chroococcum*
Видим капсулы в капле туши

К отчету о выполненной работе должны быть приложены рисунки полученных препаратов, описания микроорганизмов и методики окрашивания.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается сущность метода окраски по Граму?
2. Каковы различия в химическом составе и структуре клеточных стенок у грамположительных и грамотрицательных бактерий?

3. Из каких веществ состоят капсулы бактериальных клеток?
4. Каковы методы обнаружения капсул?

Тема 3 АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА, ВОДЫ

Занятие 5 Микробиологический анализ сред: воздуха - методом осаждения, воды и почвы - методом разбавления

План

1. Подсчет колоний микроорганизмов в чашках Петри с посевом из воздуха.
2. Учет численности микроорганизмов на агаровых пластинках с посевом из воды или почвы при разных разбавлениях.
3. Микроскопическое изучение микробов воды, почвы и воздуха
4. Пересев микроорганизмов для получения чистых культур

Материалы и оборудование

1. Чашки Петри с посеянными на предыдущем занятии культурами микробов из воздуха, воды и почвы
2. Пробирки с питательной стерильной средой для пересева.
3. Микроскопы.
4. Предметные и покровные стекла.
5. Иглы и петли для пересева.
6. Ручной бокс для пересева.
7. Спиртовка.
8. Метиленовый синий.
9. Фуксин
10. Иммерсионное масло.
11. Штатив для предметных стекол.
12. Лотки.
13. Карандаш по стеклу.
14. Ручные лупы.
15. Колбы на 100мл.
16. Пробирки.

Основные сведения

Итоги

опытов по учету микрофлоры воздуха, воды или почвы с посевами на питательные среды подводятся через 6 - 7 дней после их заложения. Все это время чашки Петри или пробирки с посевами должны находиться в термостате при температуре, указанной для данного опыта.

Колонии рассматривают через стекло, не открывая чашку Петри. Если колоний немного, их считают на всей поверхности агар-агара чашки

22

Петри, При большом количестве колоний чашку Петри кладут на лист черной бумаги, разделенный на 4 - 6 секторов, и считают количество колоний » каждом секторе. При подсчете и рассмотрении колоний рекомендуется использовать лупы.

Описание колоний микробов, выросших на питательной среде, проводят по следующим показателям; форма (округлая, неправильная); по-

верхность (гладкая, блестящая, шероховатая, сухая, складчатая); край (ровный, волнистый, городчатый); цвет, размер (диаметр)

Следует отметить, что метод подсчета колоний в чашках Петри с посевом из воздуха даст лишь приблизительные данные. Учитываются лишь микробы быстро оседающей пыли, кроме того, на твердой поверхности агар-агара прорастут только аэробные и факультативно анаэробные формы микроорганизмов. Надо учесть еще и то, что мясопептонные агаровые пластинки не являются универсальной питательной средой для микроорганизмов, на ней прорастут лишь отдельные виды микробов. Считают, что этим методом определяется от 30 до 60% микроорганизмов и спор, содержащихся в воздухе.

Более точный количественный учет микрофлоры воздуха, особенно в закрытых помещениях, производится с применением специальных приборов.

Для изучения морфологии и физиологии микроорганизмов используют чистые культуры. Существуют различные методы получения чистых культур микроорганизмов. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или одной клетки. Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный Р. Кохом. Чистую культуру получают из одной бактериальной клетки, из которой (предположительно) развивается одна колония. При этом производят многократные пересевы бактерий из отдельных колоний или накопительных (элективных) культур на питательные стерильные среды.

Аэробные микроорганизмы могут расти на поверхности плотных питательных сред, а также жидких - при постоянной аэрации или встряхивании питательной среды (глубинный способ выращивания).

Анаэробные бактерии культивируют без доступа кислорода. Их выращивают под большим слоем жидкой питательной среды или в плотной толще.

Ход работы

Питательную среду, подготовленную и простерилизованную на предыдущем занятии, надо перенести в стерильные чашки Петри. Стерильный питательный мясопептонный агар (МПА) расплавляют, погрузив пробирки на 20-25 мин в водяную баню с горячей водой. Двумя пальцами левой руки (средним и указательным) вынимают из пробирки пробку, большим пальцем и мизинцем этой же руки приподнимают крышку заранее подготовленной стерильной чашки Петри так, чтобы в щель между крышкой и

чашкой могла пройти верхняя часть пробирки, быстро выливают расплавленный агар-агар и закрывают чашку Петри. Слегка покачивая чашку, распределяют среду равномерно по ее дну и оставляют стоять на ровной поверхности.

Когда агар-агар полностью остынет и затвердеет, производят посев микроорганизмов и спор и воздуха. Для этого приготовленные чашки Петри (2-3) размещают в разных местах исследуемых помещений и на 5 мин открывают крышки. При этом микроорганизмы и споры, содержащиеся в воздухе, постепенно осаждаются на открытой поверхности агар-агара.



Рис. 15 Колонии бактерий на МПА в чашках Петри при посеве из воздуха.

Крышки закрывают, на торцовой их части восковым карандашом отмечают, кто и где производил посев.

Чашки Петри заворачивают в бумагу и помещают в термостат на 7 дней при температуре 23- 26°C. В термостате чашки Петри держат крышками вниз, чтобы конденсирующаяся влага не смачивала посева (рис. 15).

Можно поставить следующий опыт: произвести посев из воздуха в одних и тех же условиях в четыре чашки Петри; одну из них оставить для контроля, в другую влить 1 мл.

раствора пенициллина или другого антибиотика, в третью положить немного растертого лука или чеснока (фитонциды), а четвертую в раскрытом виде подвергнуть облучению ультрафиолетовыми лучами под кварцевой лампой (расстояние от лампы -- 20-30 см. время облучения - 20 мин.). Под действием ультрафиолетовых лучей гибнут микроорганизмы, но не их споры.

На питательный агар-агар в чашках Петри после посева из воздуха можно разложить диски из фильтровальной бумаги, пропитанной раствором каких-либо антибиотиков (пенициллина, стрептомицина и пр.). Расстояние между дисками должно быть 2-3 см. в этом случае можно выявить действие различных антибиотиков на микроорганизмы.

Выращивание колоний *микроорганизмов почвы на твердых питательных средах* методом разбавления. Сущности метода заключается в нанесении почвенной суспензии с микроорганизмами на поверхность твердой питательной среды. Учет количества микроорганизмов проводят по числу развивающихся колоний, предполагая, что одна микробная клетка даст начало одной колонии.

Готовят твердую стерильную питательную среду из МПА в чашках Петри. Берут 10 г почвы, вносят в колбу с 90 мл стерильной воды, хорошо встряхивают, получают первое разбавление 0,1. Взяв из первой колбы 1 мл

в пробирку с 9 мл воды, получают разбавление 0,01, так можно получить несколько разбавлений до 0,000001. Из каждой разбавления, тщательно взболтав, берут по 0,1 мл жидкости и выливают в отдельные чашки Петри (рис. 16). На боковой стенке чашки Петри отмечают степень разбавления. Все чашки ставят в термостат сначала при температуре 30°C, а затем при 20-23°C на 3-5 дней. Выросшие колонии анализируют и при необходимости определяют микроорганизмы до рода или вида (рис 17)

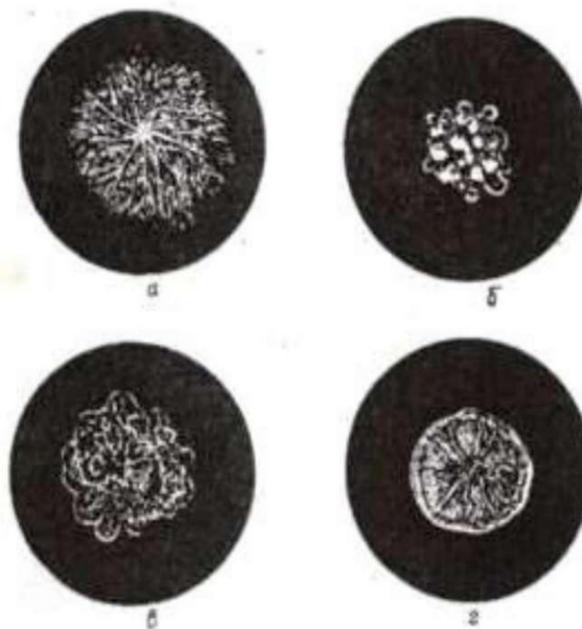
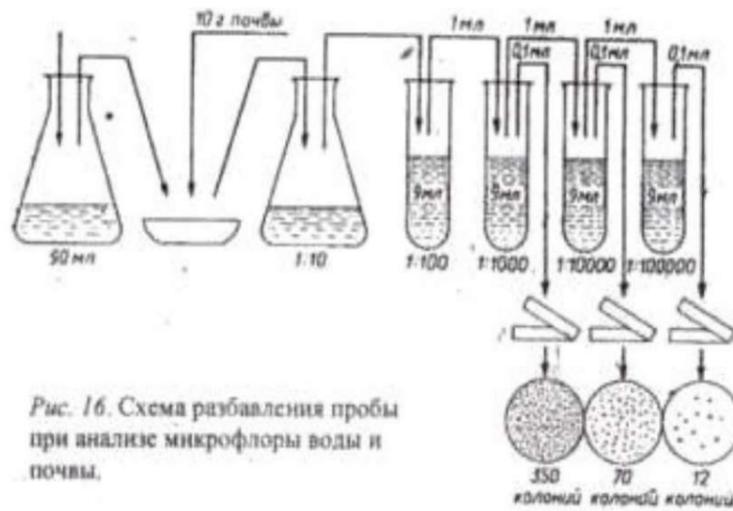


Рис 17 Формы колоний почвенных спорообразующих бактерий. а - *Bac. miscodes* б - *Bac subtilis*. в - *Bac mesentericus* г - *Bac. idosus*

Выращивание микроорганизмов почвы методом обрастания стекол по Н. Г. Холодному Чтобы вырастить микроорганизмы мочим по методу Н.Г. Холодного, в исследуемую почву закапывают стерильные предметные стекла и оставляют их на несколько недель. Вскоре поверхность стекла покрывается тонким слоем почвенного раствора, на нем и поселяются микроорганизмы. На поверхности стекол формируются характерные для данной почвы микропейзажи.

Стекла можно закопать в почву в природных условиях, в цветочных горшках или сосудах с почвой. Для этого в почве ножом делают глубокий вертикальный разрез, в который опускают стекло, оно должно быть погружено в почву на 3-5 см ниже поверхности. Почву систематически поливают.

Выращивание микроорганизмов воды. Берут питательную среду МИД в чашках Петри и воду из различных водоемов: речки, колодца, болота, лужи, - а также водопроводную, кипяченую.

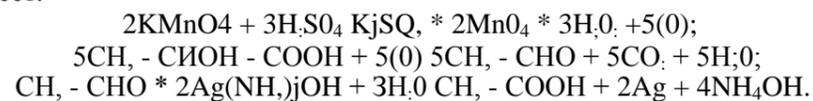
0,5 мл воды выливают на питательную среду в чашке Петри, закрывают крышку, осторожно покачивая чашку, распределяют воду по поверхности питательной среды. Чашку надписывают и ставят на проращивание.

Учет численности бактерий в воде или почве методом питательных пластин (метод Коха). Сначала готовят суспензию почвы или пробу воды методом разбавления. Подготовленные стерильные колбы и пробирки с водой нумеруют по порядку и ведут постепенное разбавление почвенной суспензии и воды по следующей схеме: 1мл исследуемой воды или 1г почвы переносят в колбу №1 (99 мл стерильной воды), получают первое разбавление до 0,01. Содержимое колбы взбалтывают, стерильной пипеткой отбирают по 1мл в пробирку №1 (9мл стерильной воды), получают разбавление 0,001, и в колбу №2 (99мл воды) разбавление 0,0001. Из колбы N2 отбирают по 1 мл в пробирку N2 и колбу №3, получая последние разбавления - 0,00001 и 0,000001 соответственно. Каждый отбор проводят стерильной пипеткой.

После тщательного взбалтывания содержимого всех сосудов берут из каждого по 0,1мл. жидкости и выливают в чашки Петри на теплый стерильный МПА. Чашки маркируют и ставят в термостат сначала при температуре 30°C. а затем при 20 - 23°C на 7 дней. Через 48 часов проводят предварительный, а через 7 дней окончательный подсчет числа выросших колоний.

Иногда может оказаться так много колоний, что они сливаются между собой, особенно в первых разведениях, а в последних - единичные Поэтому при подсчете цифры могут сильно отклоняться и результат будет недостоверным. Для правильного учета подсчитывают только чашки, в которых колоний больше 10, но не более 200, Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают подсчитанные колонии тушью, чтобы не считать дважды. Для подсчета большого числа колоний (более 200) используют счетную камеру Вольфлюгеля. Перевернутую чашку помещают на подставку камеры и накрывают стеклянной пластиной с нанесенными на нее квадратными сантиметрами. Число колоний подсчитывают в 20 25 квад-

В коническую колбу через складчатый фильтр отфильтровывают 5 мл скисшего молока, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, ставят на асбестовую сетку и нагревают до кипения, затем по каплям приливают 5 мл 5-процентного раствора перманганата калия $KMnO_4$. После чего покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра. Через некоторое время бумага чернеет.



2. Проба с фенолом (реакция Уффельмана). 10 мл 5-процентного раствора фенола внести в пробирку и прибавить несколько капель слабого раствора хлорида железа (III), в результате получится интенсивно окрашенный синий раствор. От одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащих молочную кислоту, он становится желтоватым.

3. Микроскопическое исследование микроорганизмов гомоферментативного молочнокислого брожения. Наносят на чистое предметное стекло петлей каплю кислого молока, делают мазок, высушивают его на воздухе и фиксируют смесью спирта с эфиром (1 : 1), несколько раз обливая препарат этой смесью. При такой фиксации параллельно идет извлечение эфиром жира (капельки жира мешают рассмотрению микроорганизмов). Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим в течение двух минут. Затем краситель смывают, просушивают препарат и рассматривают с иммерсией (рис. 18).

Под микроскопом можно обнаружить мелкие овальные или палочковидные клетки, нередко соединяющиеся по 2,3 и более, - *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium acidophilum*.

4. Микроскопическое исследование бактерий гетероферментативного молочнокислого брожения.

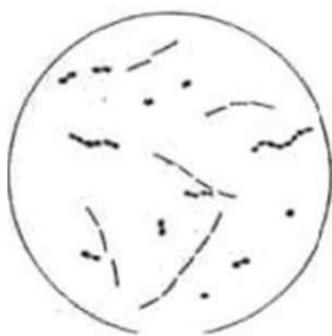


Рис 18. Микрофлора ацидофилина *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium acidophilum*



Рис 19 Микрофлора кефира *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Saccharomyces kefti*

Пересев микроорганизмов на стерильные питательные среды для получения чистых культур. Пересев производится в непосредственной близости от горящей горелки, лучше в специальных микробиологических камерах или боксах, чтобы сохранить чистую культуру. Заранее разогревают на водяной бане несколько пробирок со стерильной питательной средой до полного расплавления агар-агара. Укладывают пробирки на столе в наклонном положении для того, чтобы после застывания агар-агара получить косую поверхность. Когда среда застынет, производят посев микроорганизмов стерильными микробиологическими иглами и петлями: на косую поверхность агар-агара, делают посев штрихом с помощью петли, на прямую поверхность уколом иглы.

Для посева штрихом готовят пробирки с косой поверхностью агар-агара. Чашку Петри, из которой будут производить посев бактерий, ставят слева, иглу берут в правую руку. В левую руку между указательным и средним пальцами, так, чтобы скошенная поверхность агар-агара была хорошо видна, помешают пробирку, а большим и безымянным пальцами этой руки придерживают крышку чашки Петри; петлю прокалывают в пламени горелки.левой рукой (большим и безымянным пальцами) приподнимаю! крышку чашки Петри и петлей прикасаются к поверхности колонии. Безымянным падшем и мизинцем правой руки вынимают пробку из пробирки и, не выпуская пробки из руки, петлей с кусочком культуры осторожно проводят по поверхности агар-агара в пробирке. Вынимают петлю, стерилизуют ватную пробку в пламени горелки, закрывают пробирку и вновь стерилизуют петлю.

Для посева уколом готовят пробирки с прямой поверхностью агар-агара и иглу. всю операцию повторяют так же, как и в первом случае, только иглу после прокалывания и захвата пересеваемой колонии микробов вводят в глубь питательной среды, насколько позволяет длина ее металлической части.

После посева в течение 7 дней пробирки выдерживают в термостате при температуре 25-30 °С. в дальнейшем чистые культуры микроорганизмов в пробирках хранят при температуре 2-4°С в холодильнике.

Колонии, выросшие в пробирках, через неделю после посева рассматривают и делают вывод о чистоте посева. Устанавливают, принадлежат ли они к аэробным, анаэробным или факультативно-анаэробным микроорганизмам. В первом случае колонии разовьются только на поверхности, во втором - только в глубине агар-агара, в третьем по всей поверхности укола агар-агар.

Отчет о проделанной работе должен состоять из ее описания и зарисовок колоний, выросших в чашках Петри и после посева

Контрольные вопросы

I. Как произвести анализ микрофлоры методом разбавления?

2. Какие методы используются для анализа микрофлоры воды и почвы?
3. Как произвести подсчет количества бактерий в 1л воздуха? Насколько точным может быть такой подсчет?
4. Как получают чистые культуры микроорганизмов?
5. Как по чистой культуре можно установить, является ли микроорганизм аэробным или анаэробным?

Тема 4 ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Занятие 6 Выращивание культур микроорганизмов,
вызывающих брожение и неполное окисление
субстрата

План

- I. Постановка элективных культур микроорганизмов, вызывающих процессы неполного окисления субстрата:
 1. Спиртовое брожение.
 2. **Молочнокислое брожение.**
 3. Маслянокислое брожение.
 4. Анаэробное разложение пектиновых веществ.
 5. Анаэробное разложение клетчатки
 6. Аэробное разложение клетчатки.
 7. Аэробное окисление этилового спирта в уксусную кислоту
- II. Правила работы с чистыми культурами

Материалы и оборудование

1. Спиртовое брожение: дрожжи, 10-процентный раствор сахарозы, концентрированный и 10-процентный раствор щелочи, кристаллический йод, баритовая или известковая вода, водяная баня, горелка, треножник, термометр, колба на 200-250 мл, пробка с газоотводной трубкой, ванночка или кристаллизатор, пробирка, мензурка на 100 мл.
2. Молочнокислое брожение: свежее молоко, рассол кислой капусты, раствор фенолфталеина, 0.1 и. раствор гидроксида натрия (NaOH), дистиллированная вода, вата, коническая колба на 100-150 мл, пипетка на 20 мл, пипетка на 10 мл, коническая колба на 100 мл, термометр, бюретки
3. Маслянокислое брожение, солод, сахароза, почва (желательно садовая, с перегноем), семена гороха, мел, вода, весы с разновесами, газовая горелка, высокая пробирка и кружка
4. Анаэробное разложение пектиновых веществ: стебли льна или конопли, кружка, горелка, пробирка, нитки, пробиркодержатель, ножницы, термостат.

5. Анаэробное разложение клетчатки: питательный раствор следующего состава вода - 100 мл. пептон - 0.1 г. дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) - 0.1 г. сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05 г. хлорид кальция (CaCl_2) - 0.03 г. дигидрофосфат аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) - 0.2 г. карбонат кальция (CaCO_3) - 0.5 г, колбы на 50-100 мл, закрытые пробками с газоотводными трубками, термостат, почва, фильтровальная бумага.

6. Аэробное разложение клетчатки: кремневые пластинки в чашках Петри. фильтровальная бумага, питательная среда следующего состава: дистиллированная вода 200 мл, нитрат калия (KNO_3) - 2,5 г. дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) 1 г, хлорид натрия (NaCl) - 0.5 г, сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0.5 г, сульфат железа (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,01 г. сульфат марганца (II) ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - 0,01 г. унавоженная почва или перегной.

7. Аэробное окисление этилового спирта в уксусную кислоту: 2 конические колбы на 100-150 мл, непастеризованное пиво, 10-процентный раствор уксусной кислоты, вата, нитки, бумага, чайный "гриб"

Ход работы

Спиртовое брожение За 30 мин. до занятия дрожжи разводят в 10-процентном растворе сахарозы. В коническую колбу объемом 200-250 мл наливают 50 мл 10-процентного раствора сахарозы и 10 мл взвеси дрожжей. Колбу закрывают пробкой с газоотводной трубкой. Для собирания газа нижний изогнутый конец трубки опускают в кристаллизатор с водой и надевают на него пробирку, наполненную водой. Колбу погружают в водяную баню с температурой 30-35°C. На протяжении всего опыта такая температура поддерживается при помощи спиртовой (или газовой) горелки. Через 30-40 мин, когда весь воздух из колбы будет вытеснен углекислым газом, собирают последний в новую пробирку, которая также должна быть заполнена водой.

Молочнокислое брожение. В широкодонную колбу объемом 100-150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре 30-35°C до следующего занятия.

Мяслянокислое брожение. В кружку насыпают 5 г солода (источник органических соединений), 2 г мела (для нейтрализации масляной кислоты). 5 г сахара и все заливают 100 мл дистиллированной воды. Смесь кипятят в течение 5 мин. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, на дно которой бросают для заражения бактериями комочек почвы или семена гороха. Пробирку помещают в термостат при температуре 30-35°C на 7 дней.

Анаэробное разложение пектиновых веществ Делают снопик из 5-7 стебельков льна длиной 4-5 см. перевязывают его в двух местах ниткой. Для удаления экстрактивных веществ снопик погружают в кружку с водой и кипятят около 10 мин. Затем снопик переносят в пробирку с водой и сию-

ва кипятят, чтобы удалить из воды кислород. Для заражения среды бактериями вносят в пробирку кусочек стебля льна. Пробирку помещают в термостат при температуре 25-30°C на 10-14 дней

Анаэробное разложение клетчатки В колбу на 50-100 мл помещают полоски фильтровальной бумаги и доверху заливают питательной средой следующего состава

NH ₄ H ₂ PO ₄ - 0,2 г;	MgSO ₄ *7H ₂ O - 0.05 г;
CaCl ₂ - 0,03 г.	'пептон- 0.1 г,
KH ₂ PO ₄ - 0.1 г; CaCO ₃ ,	вода- 100 мл.
- 0.5 г;	

Затем заражают среду бактериями, внося комочек почвы (богатой перегноем), закрывают пробкой с газоотводной трубкой и помещают в термостат при температуре 30°C на 5-7 дней. Под влиянием бактерий в анаэробных условиях фильтровальная бумага будет разлагаться. Результаты опытов учитываются через 2 недели. *Аэробное разложение клетчатки* На кремневые пластинки в чашки Петри помещают фильтровальную бумагу, смоченную 2-3 мл питательного стерильного раствора следующего состава:

KNO ₃	NaCl - 0,5 г.
KH ₂ PO ₄	MnSO ₄ *SCM, - 0,01 г. H ₂ O
MgSO ₄ *7H ₂ O - 2,5 г.	- 200 мл.
0 FeS(V ₂ H ₂ O) - 1,0 г.	

Затем на поверхности фильтрата размещают в шахматном порядке 10-15 маленьких комочков почвы. Чашки Петри помещают в эксикатор над водой, а последний - в термостат при температуре 25-30°C на 15 дней.

Выращивание уксуснокислых бактерий Уксуснокислые бактерии окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды. Процесс аэробный, идет с накоплением значительного количества энергии.



Известно несколько видов уксуснокислых бактерий, например: *Acetobacter aceti*, *A. Pasteurianum*, *A. xylinum*

Все уксуснокислые бактерии грамотрицательны, имеют форму палочек, часто слагающихся в цепочки, образуют на поверхности растворов характерные пленки, состоящие из полисахаридов

Уксуснокислые бактерии окисляют спирт (вино, пиво) и другие продукты, содержащие алкоголь.

Правила работы с чистыми культурами На практических занятиях по микробиологии используют обычно чистые культуры микроорганизмов, выращенные в пробирках. Основное условие работы с этими культурами - сохранение их стерильности. Для этого необходимо знать основные правила работы с чистыми культурами. Пересев культуры из пробирки на

подготовленную среду производится микробиологической иглой с петелькой на конце (так называемой петлей) Петля предварительно стерилизуется в пламени газовой или спиртовой горелки. Работающий берет петлю в правую руку, а пробирку с культурой в левую и держит ее в несколько наклонном положении; при помощи большого пальца и мизинца (или одного мизинца правой руки, прижимая его к ладони) вынимает из пробирки ватную пробку, обжигая края пробирки в пламени горелки, и с помощью петли правой рукой берет с поверхности питательной среды немного микробной массы. Затем, снова обжигая края пробирки и пробку, плотно закрывает ею пробирку и ставит ее в штатив.

Микроорганизмы, взятые при помощи петли, переносят на предметное стекло в каплю воды. Если микроорганизмы из пробирки нужно взять еще раз, всю процедуру повторяют снова. После получения мазка петлю обязательно вторично стерилизуют. Все предметные и покровные стекла и пипетки после работы тоже тщательно дезинфицируют. Стекла и пипетки помещают в раствор фенола или спирта

Контрольные вопросы

1. Что вы понимаете под дыханием микроорганизмов?
2. Какие типы дыхания микроорганизмов вы знаете?
3. Сущность и возбудители спиртового брожения
4. Сущность и возбудители молочнокислого брожения
5. Сущность и возбудители маслянокислого брожения.
6. Сущность и возбудители уксуснокислого "брожения".
7. Использование различных типов брожения в промышленности и сельском хозяйстве.

Занятие 7. Знакомство с микроорганизмами, вызывающими брожение

План

1. Качественное определение молочной кислоты, образующейся в результате молочнокислого брожения.
2. Микроскопическое исследование микроорганизмов молочнокислого брожения: а) гомоферментативного; б) гетероферментативного.
3. Анализ продуктов, полученных в результате маслянокислого брожения.
4. Микроскопическое исследование маслянокислого брожения.
5. Микроскопическое исследование бактерий: л) разложения пектиновых веществ; б) анаэробного и аэробного разложения клетчатки; в) уксуснокислых

Материалы и оборудование

1. Культуральная жидкость с бактериями маслянокислого и молочнокислого брожения рассол капусты или огурцов. скисшее молоко, культуры бактерий пектинового брожения, анаэробного и аэробного разложения клетчатки. чайный "гриб", культура уксуснокислых бактерий
2. Красители: раствор йода, фенолфталеин, метиленовый синий
3. Реактивы: гидроксил бария, 96%-процентный спирт, серная кислота (H_2SO_4) конц., 0.1 н раствор гидроксида натрия (NaOH), 5-процентный раствор перманганата калия ($KMnO_4$) гидроксил аммония (NH₄OH). 1- процентный раствор нитрата серебра ($AgNO_3$), 1-процентный раствор хлорида железа (III), сода, смесь спирта с эфиром 1 : 1 . 5-процентный раствор фенола.
4. Иммерсионное масло.
- 5 Дистиллированная вода.
6. Предметные и покровные стекла
- 7 Предметные стекла с углублением.
8. Микроскопы.
- 9 Препаровальные иглы.
10. Стеклянные палочки.
11. Микробиологические петли.
12. Длинная стеклянная трубка.
13. Спиртовка или газовая горелка
14. Пробирки
- 15 Штативы для предметных стекол.
- 16 Фильтровальная бумага.
17. Бюретки.
- 18 Капельная и мерные пипетки на 10-20 мл.
Конические колбы на 50 мл.
Лотки.

Основные сведения

Обмен веществ у микроорганизмов складывается из двух основных процессов, энергетического (получение энергии за счет окисления субстрата) и конструктивного (биосинтез веществ в клетке). Эти два процесса неразрывно между собой связаны и происходят за счет сопряженных биохимических ферментативных реакций.

Окисление субстрата у различных микроорганизмов происходит разными путями. У аэробных микроорганизмов этот процесс протекает при участии кислорода воздуха - его называют дыханием. В результате такого окисления осуществляется полное расщепление углеводов до углекислого газа и воды, при этом выделяется значительное количество энергии, запасаемой в основном в виде молекул АТФ. У анаэробных микроорганизмов субстрат окисляется без доступа кислорода. С помощью ферментов водород отщепляется от субстрата и переносится на определенные органические акцепторы. В результате образуется ряд органических веществ, та-

ких, как спирты и органические кислоты (молочная, масляная, пропионовая), и аккумулируется небольшое количество энергии. Такой тип окисления субстрата называется брожением В зависимости от конечных продуктов, получаемых в результате брожения, его называют спиртовым, молочнокислым, маслянокислым и т.д.

Для ряда микроорганизмов характерен процесс неполного окисления субстрата с использованием небольшого количества кислорода. В этом случае окисление субстрата идет не до конца а в качестве конечных продуктов образуются кислоты: уксусная, фумаровая, щавелевая, лимонная - и ряд других соединений. Часто такой тип окисления называют окислительным брожением, что не совсем верно, так как брожение идет анаэробно, а при неполном окислении субстрата микроорганизмы используют кислород воздуха. Неполное окисление присуще следующим микроорганизмам: уксуснокислым бактериям, миксобактериям, разлагающим клетчатку и др., некоторым грибам, актиномицетам.

Спиртовое брожение Спиртовое брожение вызывается дрожжевыми грибами В процессе его молекула сахара сбраживается с образованием этилового спирта и углекислого газа:



Спиртовое брожение идет в анаэробных условиях, тогда как размножение дрожжей лучше происходит при широком доступе кислорода. Оптимальные температурные условия для спиртового брожения - 30-35°C. Образующийся спирт вреден для дрожжей, и при накоплении его процесс брожения прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15% спирта.

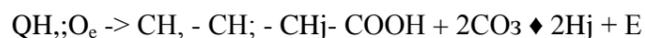
Молочнокислое брожение. Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями. В северных широтах возбудителем этого брожения являются а основном Streptococcus lactis, Lactobacillus lactis, а в южных районах - Lactobacillus bulgaricus (болгарская палочка).

В результате брожения лактоза (молочный сахар) или какой-либо другой сахар, например, глюкоза, разлагается с образованием молочной кислоты Процесс идет с накоплением энергии в виде молекул АТФ. Молочнокислое брожение суммарно может быть выражено уравнением.



Микроорганизмы, вызывающие молочнокислое брожение, по его характеру могут быть разделены на гомоферментативные, образующие из сахара только молочную кислоту (указанные выше виды), и гетероферментативные, образующие, кроме молочной кислоты, другие продукты брожения: спирт, уксусную кислоту, углекислый газ (Lactobacillus plantarum, L. fermenti, Escherichia coli).

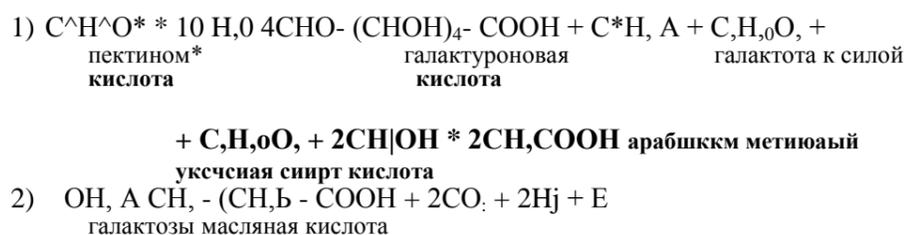
Маслянокислое брожение. При маслянокислом брожении происходит распад углеводов до масляной кислоты, углекислого газа и водорода;



Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода Clostridium.

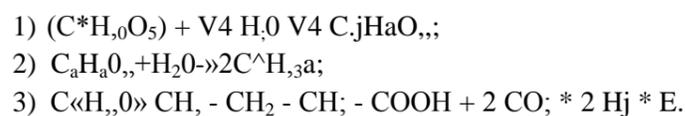
Разложение пектиновых веществ Пектины - основа межклеточного вещества. Они входят также в состав оболочек растительных клеток.

Пектиновые вещества могут разлагаться особыми анаэробными бактериями до моносахаридов, которые затем сбраживаются ими до масляной кислоты. К этим бактериям относятся Clostridium pectinovorum, имеющая форму плектридия (барабанной палочки), и C. felsineum. Ниже приводятся уравнения разложения пектиновых веществ:



Анаэробно разложение клетчатки* Анаэробное сбраживание клетчатки осуществляется почвенными целлюлозными бактериями, которые были выделены русским микробиологом В.Л. Омелянским. Бактерии были названы Bac. cellulosa methanica. Bac. cell, hydrogenic, а впоследствии Clostridium omelianskii.

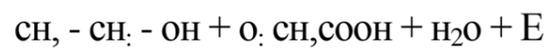
Брожение происходит по типу маслянокислое. Под воздействием ферментов целлюлазы и целлобназы бактерии последовательно гидролизуют клетчатку до целлобиозы и глюкозы; последняя сбраживается до масляной кислоты с выделением углекислого газа, водорода и метана



Аэробное разложение клетчатки Аэробное разложение клетчатки идет в поверхностных слоях почвы. Оно вызывается несколькими видами микроорганизмов извитыми бактериями (Cellvibrio, Cellfaiculai, миксо бактериями (Cytophaga, Sporocytophaga, Sorangium), некоторыми видами филов и актиномицетов. Большинство этих микроорганизмов обладает активными ферментами, гидролизующими клетчатку. Первые этапы разло-

жсния клетчатки идут так же, как и у анаэробов, - до моносахаридов. Однако в результате неполного окисления при затрате небольшого количества кислорода моносахариды разлагаются до органических кислот с выделением энергии. Дальнейшее окисление субстрата приводит к образованию углекислого газа и воды.

Уксуснокислые бактерии Уксуснокислые бактерии окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды. Процесс аэробный, хотя его часто называют брожением. Он идет с накоплением значительного количества энергии:



Известно несколько видов уксуснокислых бактерий, например: *Acetobacter aceti*, *A. pastcurianum*, *A. xylinum*.

Все уксуснокислые бактерии грамотрицательны, имеют форму палочек. Часто слагающихся в цепочки, образуют на поверхности растворов характерные пленки, состоящие из полисахаридов.

Уксуснокислые бактерии окисляют спирт (вино, пиво) и другие продукты, содержащие алкоголь.

Ход работы

Спиртовое брожение Для обнаружения углекислого газа приливают в пробирку небольшое количество баритовой или известковой воды, которая от углекислого газа мутнеет, или пробирку с углекислым газом опускают в перевернутом виде в чашку с 10-процентным раствором щелочи; через 20-30 мин. в результате взаимодействия углекислого газа со щелочью уровень жидкости в пробирке поднимается.

Для обнаружения спирта отливают в пробирку 10мл бродящей жидкости, приливают к ней 1-2 мл концентрированного раствора щелочи и подогревают до 60°C. Затем бросают несколько кристалликов металлического йода и продолжают нагревать. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, который можно определить по запаху.

Суммарное уравнение реакции получения йодоформа:



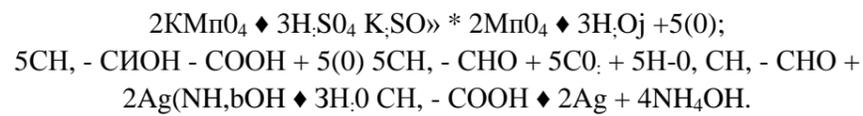
Приготовить препарат дрожжей методом раздавленной капли, окрасить метиленовым синим (рис 11).

Молочнокислое брожение Для обнаружения молочной кислоты, образовавшейся в результате деятельности молочнокислых бактерий, можно пользоваться такими качественными реакциями:

1. Перевод молочной кислоты в уксусный альдегид. Молочная кислота в кислой среде окисляется перманганатом калия до уксусного альдегида, который с аммиачным раствором оксида серебра дает реакцию серебряного зеркала.

36

В коническую колбу через складчатый фильтр отфильтровывают 5 мл скисшего молока, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. ставят на асбестовую сетку и нагревают до кипения, затем по каплям приливают 5 мл 5-процентного раствора перманганата калия KMnO₄. После чего покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра. Через некоторое время бумага чернеет:



2. Проба с фенолом (реакция Уффельмана) К 10 мл 5-процентного раствора фенола внести в пробирку и прибавить несколько капель слабого раствора хлорида железа (III), в результате получится интенсивно окрашенный синий раствор. От одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащих молочную кислоту, он становится желтоватым.

3. Микроскопическое исследование микроорганизмов гомоферментативного молочнокислого брожения. Наносят на чистое предметное стекло петлей каплю кислого молока, делают мазок, высушивают его на воздухе и фиксируют смесью спирта с эфиром (1 : 1), несколько раз обливая препарат этой смесью. При такой фиксации параллельно идет извлечение эфиром жира (капельки жира мешают рассмотрению микроорганизмов). Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим в течение двух минут. Затем краситель смывают, просушивают препарат и рассматривают с иммерсией (рис. 18).

Под микроскопом можно обнаружить мелкие овальные или палочковидные клетки, нередко соединяющиеся по 2-3 и более, - *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium acidophilum* Hum.

4. Микроскопическое исследование бактерий гетероферментативного молочнокислого брожения.

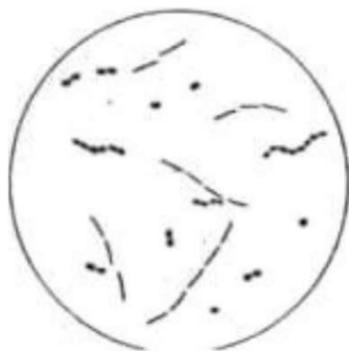


Рис 18 Микрофлора ацидофилина *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium acidophilum*



Рис 19 Микрофлора кефира *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Saccharomyces kefir*

На предметное стекло наносят небольшую кашпо рассола кислой капусты или огурцов, готовят мазок, фиксируют его, красят фуксином, промывают, высушивают и рассматривают с иммерсией. Под микроскопом можно обнаружить мелкие равномерно окрашенные бесцветные палочки *Lactobacillus fermenti*, *L. plantamm.*, *L. brassicum* (рис. 19).

5. Микроорганизмы, участвующие в порче кисломолочных продуктов. Берут пленку с поверхности кислого молока или сметаны, стоявших в теплом месте 3-5 дней. Можно взять также плесень с поверхности рассола квашеных овощей. Готовят препарат, растирая кусочек плесени в капле воды, и добавляют краситель (метиленовая синь, нейтральный красный), накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Хорошо видны крупные четырехугольные или овальные клетки молочной плесени *Oidium lactis* (рис. 20). Этот гриб окисляет молочную кислоту до оксида углерода (IV) и воды, ухудшая качество скисшего молока.

Маслянокислое брожение Для обнаружения углекислого газа CO_2 , выделяющегося при маслянокислом брожении, к испытуемой жидкости приливают раствор гидроксида бария $Ba(OH)_2$. Выпадает осадок карбоната бария. Наличие масляной кислоты в пробирке легко обнаружить по неприятному запаху прогорклого масла. Для обнаружения масляной кислоты проводят такую реакцию: наливают в пробирку 3-4 мл испытуемой жидкости, прибавляют к ней 0.5 мл 90-процентного спирта и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают. В присутствии масляной кислоты появляется характерный запах масляноэтилового эфира, напоминающий запах ананаса:



При микроскопическом исследовании бактерий маслянокислого брожения можно использовать метод висючей капли или метод фиксации с окраской фуксином. Каплю жидкости при приготовлении препарата берут стеклянной трубкой или пипеткой со дна высокой пробирки (маслянокислое брожение происходит в анаэробных условиях». Один из главных возбудителей маслянокислого брожения - бактерия *Clostridium pasteurianum*. Эта подвижная палочка в период спорообразования приобретает форму веретена вследствие того, что спора образуется в середине клетки (рис. 21). Зарисовывают рассматриваемые бактерии



Рис 21 *Clostridium pasteurianum* (возбудитель маслянокислого брожения)



Рис 20 Молочная плесень *Oidium lactis*

Бактерии разложения пектиновых веществ После брожения (после постановки см. в занятии 7) вынимают из пробирки снопики льна. Обнаруживают, что лубяные волокна легко отделяются от других тканей.

Готовят препарат живых бактерий *Clostridium pectinovorum* Для этого пинцетом отжимают из снопика на предметное стекло каплю жидкости. окрашивают ее раствором йода. накрывают стеклом и рассматривают под микроскопом с иммерсионной системой Бактерии *Clostridium pectinovorum* можно рассматривать при фиксации и окраске. Они имеют плектридиальную форму (рис. 22).

Бактерии анаэробного разложения клетчатки Извлекают из бродильной жидкости фильтровальную бумагу. Пинцетом счищают с нее на предметное стекло каплю жидкости, приготавливают мазок, фиксируют.

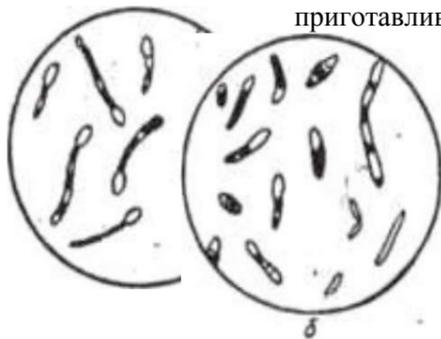


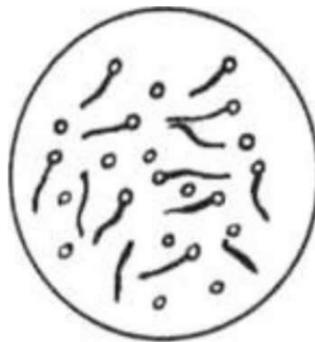
Рис 22. Возбудители брожения пектиновых веществ
Clostridium pectinovorum (а); *Clostridium omelianskii* (б)

окрашивают фуксином и рассматривают с иммерсионной системой. На препарате видны тонкие изогнутые палочки и плектридии целлюлозных бацилл, отдельные споры, а также микроорганизмы-спутники. Анаэробное разложение клетчатки в основном является результатом жизнедеятельности *Clostridium omelianskii*. Это длинные тонкие палочки, слегка изогнутые; на концах палочек - шаровидные споры, значительно превосходящие толщину клетки, т.е. бактерии имеют плектридиальную форму (рис. 23).

Бактерии аэробного разложения клетчатки. Рассматривают колонии микроорганизмов аэробного разложения клетчатки, выросших на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Вокруг комочков почвы можно видеть зоны, окрашенные в желтый, оранжевый, зеленый цвета, а также бесцветные юны клетчатки, подвергшейся разрушению. Эти изменения свидетельствуют о развитии микроорганизмов, разлагающих клетчатку.

Рис 23. *Clostridium omelianskii*

Из цветных колоний готовят мазок, фиксируют, окрашивают фуксином,



рассматривают с иммерсионной системой. В желтой слизистой влажной колонии, обнаруживается бактерия рода *Cytophaga*, относящаяся к группе целлюлозоразлагающих миксобактерий.

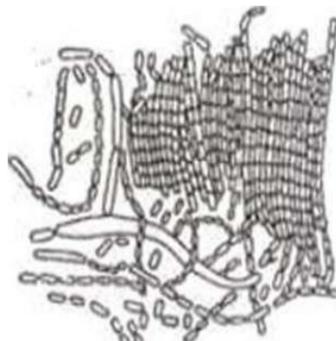
Кроме *Cytophaga*, в чашках Петри можно обнаружить, колонии других миксобактерий - *Sporocytophaga*, *Sorangium*. Клетки этих бактерий вытянуты, иногда заострены на концах. Они способны образовывать микро-цисты, из которых формируются плодовые тела. При созревании из цист выходят молодые вегетативные клетки. Миксобактерии обладают способностью к скользящим движениям по субстрату. Они интенсивно разлагают клетчатку,

К аэробам, разлагающим клетчатку, относятся также представители рода *Cellvibrio*. Клетки этой бактерии мелкие, слегка изогнутые. При развитии на субстрате некоторые виды этого рода образуют зеленый и желтый пигменты, которые окрашивают бумагу в соответствующие цвета.

Кроме этих бактерий, в разложении клетчатки принимают активное участие *Cellfalcicula viridis*. Клетки которой имеют палочковидную форму с заостренными концами или веретенообразную. При развитии этой бактерии на фильтрованной бумаге возникают зеленые пятна.

Аэробно разлагают клетчатку также некоторые грибы (из родов *Fusarium*, *Aspergillus* и др.) и актиномицеты.

Уксуснокислые бактерии - бесспорные грамотрицательные малоподвижные палочки. Они растут и размножаются на поверхности питательных сред, образуя тонкие пленки, так как являются облигатными аэробами. *Acetobacter xylinum* образует более толстые и плотные пленки, так как клеточные оболочки этих бактерий содержат в своем составе целлюлозу. При неблагоприятных условиях клетки уксуснокислых бактерий разрастаются, принимая необычную (инволюционную) форму утолщенных длинных нитей.



Для обнаружения в питательной среде уксусной кислоты 5 мл скисшего пива наливают в пробирку, добавляют небольшое количество соли и раствор хлорида железа (III). В присутствии уксусной кислоты при нагревании появляется темно-красное окрашивание ацетата железа:



Рассматривают образовавшуюся в колбе пленку, в которой обычно можно найти: а) *Acetobacter acetii* - короткую неподвижную палочку, образующую гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода (рис. 24); б) *Acetobacter pasteurianum*, которая образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся раствором йода в синий цвет; в) *Acetobacter xylinum*, образующую толстую, слизи-

стую пленку. Приготавливают мазок, окрашивают его раствором йода и рассматривают под микроскопом.

Для знакомства с уксуснокислыми бактериями можно приготовить препарат из пленки чайного «гриба», состоящей из уксуснокислых бактерий и одного из видов дрожжей (*Candida*), живущих в симбиозе с бактериями.

Как известно, чайный «гриб», растет на растворе сахара. Дрожжи сбраживают сахар до этилового спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

Делают мазок из пленки чайного «гриба», препарат фиксируют, окрашивают раствором йода и рассматривают под микроскопом. На препарате видны палочки, собранные в цепочки *Acetobacter xylinum*, и округлые клетки дрожжей.

Можно рассматривать препарат методом раздавленной капли. Отчет о выполненной работе должен содержать рисунки всех изученных микробов и записи уравнений реакций

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы вызывают спиртовое брожение?
2. Какими способами можно обнаружить спирт и углекислый газ при спиртовом брожении?
3. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое и маслянокислое брожение?
4. Каким способом можно обнаружить мочевую кислоту?
5. Как можно обнаружить масляную кислоту в культуральной среде?
6. Какие микроорганизмы вызывают процессы анаэробного разложения клетчатки?
7. Как протекает процесс разложения пектиновых веществ? Напишите уравнения реакции
8. В чем практическое значение процессов разложения пектиновых веществ?
9. В чем особенности жизнедеятельности чайного «гриба»?

Тема 5 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ

Занятие 8. Выращивание микроорганизмов, участвующих в круговороте азота

План

1. Аммонификация
2. Азотфиксация
3. Нитрификация
4. Денитрификация.

Материалы и оборудование

1. Культуры азотфиксирующих, аммонифицирующих, нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий.
2. Корни бобовых растений с клубеньками (фиксированные в спирте или свежевывращенные в почве).
3. Реактивы: Несслера и Грисса, соли для элективных сред.
4. Раствор дифениламина в серной кислоте
5. Красители: фуксин, метиленовый синий.
6. Иммерсионное масло.
7. Микроскопы.
8. Предметные и покровные стекла.
9. Предметное стекло с вышлифованным углублением.
10. Лезвия безопасных бритв.
11. Стекланные палочки.
12. Пипетки: на 10 мл - 1 шт., на 1 мл 4 шт., капельные пипетки.
13. Пробирки - 6 шт.
14. Кристаллизатор.
15. Фарфоровая чашечка.
16. Штативы для предметных стекол.
17. Лотки.

Основные сведения

Микроорганизмам принадлежит очень большая роль в круговороте азота на Земле. Все высшие и большинство низших растений синтезируют белок из связанного азота и углеводов. Животные используют в питании белки, накопленные растениями. Отмирая, животные и растения обогащают почву белковыми веществами, которые под влиянием гнилостных бактерий разлагаются до аммиака. Аммиак частично используется бактериями для их жизнедеятельности, основная же его масса либо непосредственно усваивается высшими растениями, либо подвергается в почве нитрификации. В результате процесса нитрификации, осуществляемого микроорганизмами в почве, образуются нитраты, которые могут активно поглощаться многими растениями. При определенных условиях эти азотсодержащие

42

вещества могут частично подвергаться процессу денитрификации, т.е. восстановлению до молекулярного азота; денитрификацию вызывают особые группы бактерий. Бактерии-азотфиксаторы усваивают атмосферный азот и переводят его в восстановленные формы. Так при участии бактерий происходит круговорот азота в природе.

В ходе занятия студенты должны подготовить питательные среды и произвести посев микроорганизмов, вызывающих процессы аммонификации, нитрификации, денитрификации и связывания атмосферного азота.

Микроорганизмы в питательные среды в большинстве случаев вносят с почвой. Выросшие бактерии рассматривают на двух следующих занятиях.

Гниение (аммонификация) - один из наиболее распространенных процессов на земной поверхности. Сущность его заключается в распаде органических азотсодержащих веществ до аммиака, т.е. превращении органической формы азота в аммиачную. Поэтому процесс гниения получил название аммонификации. Он происходит везде, где есть органические остатки. Особенно распространен этот процесс в почве.

Аммонификация вызывается различными группами микроорганизмов (бактериями, актиномицетами, плесневыми грибами); все они получили название аммонификаторов. Процесс гниения происходит как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Наилучшими условиями для аммонификации является температура 25...30°C и достаточная влажность.

Процесс нитрификации заключается в окислении бактериями аммиака до азотной кислоты. Этот процесс идет в две фазы: в первой фазе аммиак под влиянием бактерий рода *Nitrosomonas* и др. окисляется до азотистой кислоты. Вторая фаза вызывается бактериями, относящимися к роду *Nitrobacter*, окисляющими азотистую кислоту до азотной.

Энергию, выделяемую при окислении неорганических соединений (аммиака и азотистой кислоты), микроорганизмы используют для синтеза органических веществ, для роста и размножения. Нитрификаторы относятся к группе хемосинтезирующих бактерий, за счет химической энергии они синтезируют органические вещества из неорганических. Бактерии-нитрификаторы не могут использовать готовые органические вещества.

Денитрификация - процесс, по своему действию обратный нитрификации. В почве он вызывается различными микроорганизмами, такими, как *Pseudomonas fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus denitrificans* и другими.

Все денитрифицирующие бактерии бесспорные, относятся к факультативным анаэробам. При доступе большого количества кислорода они не восстанавливают нитраты. Лучше всего денитрификация идет при наличии влаги, нитратов и органического вещества.

Главными *фиксаторами молекулярного азота* являются бактерии. Одни из них, например, клубеньковые бактерии, живут в симбиозе с растениями, другие - в свободном состоянии в почве (*Azotobacter chroococcum*, *Clostridium pasteurianum*). *A. chroococcum* - облигатный а>-

роб. свободно живущий в почве и интенсивно фиксирующий свободный азот. В молодом возрасте это подвижная крупная короткая палочка с закругленными концами и перитрихальным расположением жгутиков. Клетки образуют слизистую капсулу. По мере старения подвижность клеток утрачивается, они приобретают шаровидную форму и располагаются попарно: слизистая капсула в это время уплотняется. Образуется темно-коричневый пигмент, придающий колониям характерный цвет.

Для выращивания *Azotobacter chroococcum* необходима нейтральная питательная среда, содержащая минеральные соли и органические вещества (углеводы, спирты, кислоты).

В настоящее время изучены другие виды рода *Azotobacter*: *A. agilis*, *A. vinelandii*, - которые различаются между собой размерами, формой клеток, пигментацией колоний, а также бактерии родов *Desulfohalobium* и *Beijerinckia*.

Клубеньковые бактерии относятся к роду *Rhizobium*. В почве это свободноживущие мелкие подвижные палочки. Фиксацию молекулярного азота они способны осуществлять в симбиозе с корнями бобовых растений определенных видов. Проникновение бактерий в паренхиму корня проис-

ходит через молодые корневые волоски Клубеньковые бактерии выделяют вещества, стимулирующие деление клеток паренхимы корня, в результате чего и образуются клубеньки. В них клетки бактерий становятся более крупными, неподвижными, приобретают неправильную форму; это их инволюционные формы, или бактериоиды.

Клубеньковые бактерии снабжают растения соединениями азота Бобовые растения обеспечивают бактерии безазотистыми веществами и создают для них оптимальные условия существования.

Бактерии, вызывающие аммонификацию. Среди аммонификаторов наиболее распространенную группу составляют аэробные гнилостные бактерии: *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis*, *Bac. megaterium*. Сюда же относится *Bac. mycoides* - бактерия, имеющая форму палочки; на твердой питательной среде она образует колонии, по внешнему виду напоминающие мицелий гриба (рис. 5, 17).

Bac. subtilis, или сенная палочка, характеризуется тем, что ее клетки в результате деления не расходятся, а образуют цепочки. На третий день после посева она формирует споры (рис. 3).

Bact. marcescens (*Serratia marcescens*), или «чудесная палочка», синтезирующая кроеный пигмент, тоже относится к гнилостным бактериям

Вторая группа - факультативные анаэробы. Наиболее широко распространенный вид, относящийся к этой группе, - *Proteus vulgaris*. Этот микроорганизм в зависимости от условий и состава питательной среды может иметь весьма разнообразные форму и величину: от короткой палочки до длинной, вытянутой, иногда изогнутой под прямым углом.

К третьей относятся анаэробы, представителем которых является *Bac. putrificus* - спорообразующий микроб, имеющий вид барабанной палочки.

Микробы, вызывающие нитрификацию

Бактерии, окисляющие аммиак до азотистой кислоты (нитрозные), относятся к роду *Nitrosomonas*. Эти бактерии имеют овальную форму клеток, почти неподвижны (рис. 25). В результате их жизнедеятельности (в первой фазе нитрификации) из аммиачных солей в питательном растворе образуется азотистая кислота. Наличие этой кислоты устанавливают реактивом Грисса.

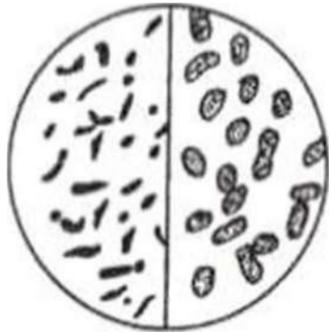


Рис 25
Бактерии-нитрификаторы с лева
- *Nitrosomonas* sp ; справа -
Nitrobacter sp

Под действием микроорганизмов рода *Nitrosomonas* азотистая кислота окисляется до азотной. *Nitrobacter* имеет вид мелких неподвижных папочек (рис. 25). Наряду с ним, могут быть формы, дающие скопления бактериальных клеток (зооглеи). Клетки *Nitrobacter* характеризуются полиморфностью.

Ход работы

Выращивание культур микроорганизмов, участвующих в превращениях азотистых веществ
Выращивание бактерий - аммониторов :

1. В две колбочки на 100 мл наливают по 50 мл воды и вносят по 1 г пептона и по комочку почвы, которая всегда содержит гнилостные бактерии. Закрывают колбочки ватными пробками, в пробках укрепляют в одной красную лакмусовую бумажку (индикатор на аммиак), а в другой - бумажку, пропитанную раствором ацетата свинца (индикатор на сероводород). Ставят колбы в термостат при температуре 25...30°C на 7...8 дней.

2. Производят посев *Serratia marcescens* («чудесной палочки») на естественную стерильную питательную среду. Для этого из пробирки с чистой культурой бактерии стерильной петлей делают посев в чашки Петри на ломтики картофеля. До стерилизации ломтики картофеля протирают кусочком мела для нейтрализации органических кислот в субстрате.

3. Приготовление элективной питательной среды для выращивания *Bac. subtilis* (сенной палочки). 5-10 г сена помешают в коническую колбу объемом 500-1000 мл, приливают 200 мл воды и кипятят в течение 20-30 мин. Жидкость сливают в коническую колбу с широким дном и кипятят раствор, добавив в него кусочек мела. Для заражения бактериями в колбу вносят несколько стебельков сухого сена, затем ее закрывают ватной пробкой и ставят в термостат с температурой 25-30°C на 2-3 дня.

Выращивание бактерий, вызывающих нитрификацию. Для выращивания и накопления культуры бактерий рода Nitrosomonas, вызывающих первую фазу нитрификации, пользуются селективной питательной средой Омелянского и Виноградского, которая не содержит органических веществ Состав среды следующий:

NH ₄ Н ₂ Р ₀ ₄	- 0,2 г,	FeSO ₄ *7H ₂ O	-0,04 г,
K ₂ НР ₀ ₄	-0,1 г,	MgCO ₃ ,	-0,5 г,
MgSO ₄ *7H ₂ O	-0,05 г;	дистиллированная	
NaCl	-0,2 г.	вода	-100мл.

Взвесив все соли, их высыпают в коническую колбу на 1000 мл. наливают 100 мл дистиллированной воды, тщательно размешивают, вносят комочек почвы, закрывают колбу ватной пробкой, прикрепляют этикетку и ставят в термостат с температурой 25-30°C на 15. а лучше на 20 дней.

Для выращивания бактерий, вызывающих вторую фазу нитрификации (род Nitrobacter), готовят среду следующего состава:

NaNO ₂	-0.1 г.	NaCl	-0,05 г.
MgSO ₄ *7H ₂ O	-0.05 г;	K ₂ НР ₀ ₄	-0,05 г;
Na ₂ CO ₃	-0.1 г;	FeSO ₄ *7H ₂ O	-0.04 г.

Приливают 100 мл дистиллированной воды, размешивают, вносят комочек почвы, закрывают колбу ватной пробкой, прикрепляют этикетку и ставят в термостат на 15 дней

Нитрифицирующие бактерии можно выращивать также на твердой питательной среде (твердая селективная питательная среда по Виноградскому). Приготовление кремневых пластинок для этой среды описано выше.

Кремневые пластинки для микробов первой фазы нитрификации в чашках Петри пропитывают 2 мл питательной среды следующего состава:

(NH ₄) ₂ SO ₄	-2,0 г;	FeSO ₄ *7H ₂ O	-0.04 г;
K ₂ НР ₀ ₄	-1,0 г.	MgCO ₃ , или CaCO ₃ ,	-5 г:
MgSO ₄ *7H ₂ O	-0.5 г;	дистиллированная	
NaCl	-2,0 г.	вода	-200 мл.

Чтобы получить селективную твердую питательную среду для микробов второй фазы нитрификации, вместо сульфата аммония (NH₄)₂SO₄ берут 2 г нитрита натрия NaNO₂.

После того, как избыток воды впитается гелем и частично испарится, на пластинке в шахматном порядке раскладывают мелкие комочки почвы, закрывают чашку Петри и ставят ее в эксикатор над водой, а последний и термостате температурой 25-30°C на 15-20 дней.

Выращивание бактерий, вызывающих денитрификацию. Готовит питательную среду, в которую входят:

K ₂ НР ₀ ₄	- 0,05 г. KNO ₃	-5 г,
кальциевая соль лимонной или яблочной кислоты	дистиллированная	
	-2.0 г; вода	-100 мл.

Кальциевую соль органической кислоты можно заменить 2-процентным раствором глицерина."

Питательную среду кипятят и после остывания выливают в высокую пробирку, на дно которой бросают комочек почвы. Закрывают пробирку ватной пробкой, ставят в термостате температурой 25-30 С на 15 дней.

В ы р а щ и в а н и е а з о т о б а к т е р а . Стерильная питательна* среда для азотобактера имеет следующий состав:

сахароза -2,0 г.	MgS(V7H,0	-0,03 г,
K ₂ HP0 ₄ - 0,02 г, агар-агар		- 2,0 г,
CaCO ₃ - 0,5 г, дистиллированная вода - 100 мл.		

Стерилизуют чашку Петри, разогревают приготовленную и находящуюся в пробирке стерильную питательную среду, выливают ее в чашку Петри и закрывают крышкой. После того, как масса застынет, на ее поверхность наносят несколько комочков почвы. Чашку подписывают и ставят в термостат при температуре 25°С' на 6-7 дней.

Контрольные вопросы

1. Как поставить селективную культуру бактерий-аммонификаторов?
2. В каких условиях идет процесс нитрификации?
3. В чем сущность процессов микробиологической и «косвенной» денитрификации?
4. Как поставить селективную культуру азотобактера?

Занятие 9. Изучение бактерий, участвующих в превращениях соединений азота

План

Микроскопическое исследование бактерий:

- а) аммонификации;
- б) азотфиксации;
- в) нитрификации;
- г) денитрификации.

Материалы и оборудование

1. Элективные культуры бактерий, участвующих в превращении соединений азота.
2. Корни бобовых растений с клубеньками (фиксированные в спирте или свежевывращенные в почве).
3. Реактивы: Нesslerа и Гресса.
4. Раствор дифениламина в серной кислоте.
5. Красители: фуксин, метиленовый синий.
6. Иммерсионное масло
7. Микроскопы.
8. Предметные и покровные стекла.
9. Предметное стекло с вышлифованным углублением.
10. Лезвия безопасных бритв.
11. Стекланные палочки.
12. Пипетки: на 10 мл - 1 шт., на 1 мл - 4 шт., капельные пипетки.
13. Пробирки - 6 шт.
14. Кристаллизатор.
15. Фарфоровая чашечка
16. Штативы для предметных стекол.
17. Лотки.

Ход работы

Аммонификация В колбах, где происходил процесс аммонификации, при помощи бумажных индикаторов определяют наличие сероводорода и аммиака. Аммиак можно также обнаружить при помощи реактива Нesslerа. В зависимости от концентрации аммиака жидкость окрашивается в желтый, оранжево-желтый и красно-бурый цвета. В пробирку приливают приблизительно по 2-3 мл испытуемой жидкости и столько же реактива Нesslerа. При проведении всех цветных реакций необходимо внимательно следить за тем, чтобы мерные пипетки были абсолютно чистыми, а для реактивов использовались отдельные капельные пипетки.

Для микроскопического исследования аммонифицирующих бактерий наносят каплю культуральной жидкости на предметное стекло, приготавливают мазок, фиксируют и окрашивают фуксином. На препарате, как правило, обнаруживается бактерия *Proteus vulgaris*, имеющая форму либо короткой, либо длинной палочки (рис. 7). Кроме того, можно видеть и другие аммонифицирующие бактерии, видовую принадлежность которых бывает трудно установить, так как выращивание производилось не в чистой культуре.

Сенную палочку (*Bac. subtilis*) рассматривают на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из поверхностной пленки бактерий, выращенных в элективной питательной среде (рис. 3).

Для рассмотрения *Serratia marcescens* мазок готовят из красной колонии, выросшей на ломтике картофеля в чашке Петри. Видны мелкие палочки. спор они не образуют.

Азотфиксация Микроскопическое исследование *Azotobacter chroococcum*. В чашках Петри на твердой среде вокруг комочков почвы образуются темно-коричневые слизистые колонии *Azotobacter chroococcum*. Приготавливают фиксированный и окрашенный фуксином препарат, клетки бактерий имеют шаровидную форму и соединены попарно; вокруг клеток видны капсулы. Обнаружить капсулу можно при негативной окраске препарата тушью или нигрозином в раздавленной капле (рис. 14).

Микроскопическое, исследование клубеньковых бактерий и клубеньков бобовых растений. Из клубеньков на предметное стекло выдавливают содержимое. Приготавливают мазок, фиксируют и окрашивают метиленовым синим. На препарате видны бактериоиды и палочковидные клубеньковые бактерии.

Клубеньковые бактерии можно рассмотреть, и в живом состоянии в раздавленной или висячей капле.

Анатомическое исследование клубеньков. Для исследования делают ряд тонких срезов через клубенек корня фасоли, гороха, конских бобов. Срезы рассматривают в капле воды при большом увеличении. Срез можно слегка подкрасить метиленовым синим. Клубенек представляет собой сильно разросшийся участок клеток паренхимы корня. Паренхимная ткань, содержащая значительное количество бактерий, называется бактериоидной.

Нитрификация Проводят анализ на азотистую кислоту в колбах, где происходила первая фаза нитрификации. Для этого в чистую пробирку наливают примерно 1 мл реактива Грисса, кипятят, прибавляют 1 мл испытуемой жидкости и снова кипятят. В присутствии азотистой кислоты появляется красное окрашивание.

Выясняют, образовалась ли в культуральной жидкости с *Nitrobacter* (вторая фаза нитрификации) азотная кислота. Наличие ее в среде можно установить по реакции с дифениламином, растворенным в крепкой серной кислоте. Посинение жидкости говорит о наличии в ней азотной кислоты.

Однако надо помнить, что дифениламин дает реакцию не только с азотной, но и с азотистой кислотой. Поэтому о появлении в растворе азотной кислоты можно судить лишь после того, как реактивом Грисса будет установлено, что в жидкости нет азотистой кислоты.

Реакцию на азотную кислоту проводят в фарфоровой чашке, смешивая в ней несколько капель испытуемой жидкости с раствором дифениламина.

Из культуральных жидкостей первой к второй фазе нитрификации готовят мазки, фиксируют и окрашивают их фуксином. Рассматривают под микроскопом и зарисовывают (рис. 25).

Денитрификация В результате денитрификации происходит восстановление оксидов азота до молекулярного азота. О том, что происходит денитрификация, можно судить по выделению пузырьков газа со дна пробирки, а также по исчезновению в питательном растворе азотной и азотистой кислот (см. реакцию на азотную и азотистую кислоты).

Бактерии, вызывающие денитрификацию, бесспорные, очень мелкие. имеют форму коротких палочек, иногда почти овальные. К денитрификаторам относятся следующие бактерии: *Pseudomonas fluorescens*, *P. stutzeri*, *Micrococcus denitrificans*.

Все денитрификаторы - факультативные анаэробы, поэтому для приготовления препарата каплю жидкости надо брать со дна пробирки, где процесс идет наиболее энергично.

Препарат фиксируют, окрашивают фуксином и рассматривают под микроскопом с иммерсией, делают зарисовки.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность процесса аммонификации и в каких условиях он может идти?
2. Перечислите виды бактерий-аммонификаторов.
3. При участии каких микроорганизмов протекает процесс нитрификации?
4. Какие соли, содержащие азот, следует добавлять в питательные среды для выращивания бактерий *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*?
5. С помощью каких качественных реакций можно обнаружить в культуральной жидкости наличие нитритов, нитратов и аммиака?
6. Какие условия необходимы для выращивания денитрифицирующих бактерий?
7. Какие газообразные вещества выделяются в процессе денитрификации?
8. Какие микроорганизмы могут усваивать молекулярный азот?

Тема 6. ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Занятие 10. Знакомство с некоторыми микроорганизмами- возбудителями болезней растений

План

Микроскопическое исследование:

- 1) фитопатогенных бактерий, вызывающих мокрую гниль клубней картофеля - *Bact. xanthochlorum schusier*.
- 2) фитопатогенных грибов: картофельного грибка - *Phytophthora infestans*, снежной плесени озимых посевов - *Fusarium nivale*, черной хлебной плесени - *Rhizopus nigricans*, плесени, поражающей овощи и фрукты, грибов из рода *Sclerotinia*.

Материалы и оборудование

1. Культуры исследуемых бактерий и грибов.
2. Фуксин.
3. Микроскоп.
4. Препаратные и покровные стекла.
5. Иммерсионное масло
6. Иглы и петли для пересева
7. Препаровальные иглы.
8. Стекланные палочки. *
9. Газовая горелка или спиртовка.
10. Штативы для предметных стекол.
11. Лотки.

Основные сведения

Существует очень много микроорганизмов, вызывающих различные заболевания растений. Значительная часть болезней растений имеет бактериальное или вирусное

происхождение; основная же масса болезней вызывается различными патогенными грибами.

Бактерия, вызывающая мокрую гниль *Bact xanthochlorum schuster*, легко проникает через поврежденные покровные ткани в клубень картофеля. Бактерии разлагают межклеточное вещество, протоплазму клеток, разрушают ткани, что в конце концов приводит к гибели клубня. Бактерии хорошо размножаются на картофеле во влажных, плохо проветриваемых овощехранилищах. Меры предохранения от заражения состоят в том, чтобы хранить картофель в сухом прохладном помещении.

Плесневые грибы Тело гриба - мицелий - состоит из тонких нитей, или гиф, переплетенных между собой. У низших грибов мицелий несегментированный - не имеет поперечных перегородок, а у высших грибов гифы имеют перегородки и расчленены на клетки. При бесполом размножении у грибов образуются спорангии, содержащие споры (споры эндогенного происхождения) или же конидии (споры экзогенного происхождения).

Конидии отрываются и разносятся ветром, а спорангоспоры образуются внутри спорангия и освобождаются при разрушении его стенки.

При классификации фитопатогенных грибов и определении их вида большое внимание уделяется строению мицелия и органов размножения.

Грибы - бесхлорофильные микроорганизмы, живут на поверхности различных субстратов. Клетки грибов имеют дифференцированное ядро, поэтому их относят к эукариотам. Плесневые грибы не требовательны к питательным средам, но большинство из них нуждается в кислороде воздуха. Они легко переносят низкие температуры, могут жить и размножаться в холодильных камерах. Среди грибов встречаются как сапрофиты, как и паразиты. Все грибы делятся на высшие и низшие и относятся к шести классам.

Хитридные (Chytridiomycetes). оомицеты (Oomycetes). зигомицеты (Zygomycetes) относят к низшим грибам: аскомицеты (Ascomycetes). бази- дномиицеты (Basidiomycetes) и дейтеромицеты. или несовершенные фицм I Deutromycetes. Fungi imperfecti). - к высшим

Грибы не имеют хлорофилла, поэтому они используют для своего питания углерод только из готовых органических соединений, то есть они являются гетеротрофами. Все грибы, кроме примитивных низших и некоторых высших (дрожжей), имеют вегетативное тело - мицелий, или грибницу,- состоящее из тонких ветвящихся гиф. Мицелий может быть погруженным (субстратный), развивающимся внутри среды и поверхностным (воздушный), развивающимся на поверхности среды. У низших грибов он одноклеточный. Септы (перегородки) перфорированы, что обеспечивает сообщение между клетками и таким образом создает замкнутую систему, состоящую из гиф (трубочек), заполненных цитоплазмой и множеством ядер Иногда мицелий грибов образует ризоиды - корешкообразные выросты, при помощи которых крепится к субстрату и получает питательные вещества.

Склероции сплетение гиф округлой или продолговатой формы. Они имеют большие размеры, уплотнены, устойчивы к неблагоприятным воздействиям среды, содержат мало воды и много питательных веществ. У некоторых высших грибов склероции представляют почкующуюся стадию мицелия.

Многие грибы образуют хламидоспоры - разрастания мицелия с утолщенной оболочкой, внутри которых содержатся питательные вещества. Они могут быть одно- и многоклеточными и служат для сохранения вила, так как хорошо переносят неблагоприятные условия среды.

От мицелия отходят плодоносящие тела спорангиеносцы у мукоровых и конидиеносцы у монилковых. Спорангиеносцы заканчиваются расширением - спорангием с эндоспорами. При разрыве спорангия эндоспоры освобождаются и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени. На конидиеносцах образуются конидии, или экзоспоры. Они имеют разную форму: шаровидную, булабовидную, продолговатую и т. д. Конидии могут быть одиночные, когда образуются по одной на каждом ответвлении конидиеносца. и множественными, если образуется несколько конидий. Конидиеносцы бывают простые (неразветвленные) и разветвленные. Разветвленные имеют на конце ветвления - верхушечные клетки бутыловидной или асретеновидной формы, называемые фиалками у пеницилла. У аспергилла такие клетки имеют форму шипов и называются стернгами. Они располагаются на расширении конидиеносца и бывают одно- и двухъярусные. Нижняя клетка стернгам несет несколько клеток второго яруса.

Рост на сусле-агаре Мукор(Mucor mucedo) - представитель класса зигомицетов - растет в виде пушистого серого налета. Рост появляется в течение первых суток. Аспергилл (лечная плесень) - представитель класса дейтеромицетов. Растет медленнее. Рост появляется на вторые сутки.

Конидии могут быть черного цвета (*Aspergillus niger*), желто-зеленого (*Asp. fumigatus*), желтого (*Asp. flavus*) и зеленовато-желтого (*Asp. oryzae*). Пеницилл (клетевик) - представитель класса дейтеромикотозов, образует на среде нежный налет и виле пушка серо-зеленого цвета или ярко-зеленого с белым ободком по периферии. Хорошо выраженные кисточки появляются на вторые-третьи сутки.

Ход работ и

Бактерии, вызывающие мокрую гниль картофеля Препаровальной иглой снимают небольшое количество слизистого налета с клубня картофеля, пораженного мокрой гнилью *Bact. xanthochlorum schusteri*. размещают его на предметном стекле в капле воды. Мазок фиксируют, окрашивают фуксином и рассматривают с иммерсионным объективом. В поле зрения микроскопа видны бактерии, имеющие форму небольших палочек. Рассматриваемые микробы зарисовывают.

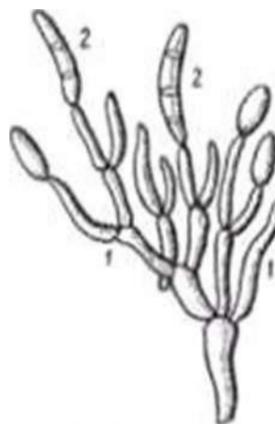
Фитопатогенные грибы **Приготовление препаратов** Плесневые грибы рассматривают в препарате «раздавленная капля», для чего материал препаровальными иглами распределяют на предметном стекле в капле изотонического раствора хлорида натрия или стерильной воде.

Препарат мукора готовят из односуточной культуры, аспергилла и пеницилла из двухсуточных. В культуре мукора и аспергилла лучше брать серые головки, пеницилла - на границе серого и зеленого по периферии колонии. У аспергилла с серыми, но не с черными конидиями бывают хорошо видны стеригмы в виде лепестков подсолнечника. Мукор рассматривают под малым увеличением (объектив 8), аспергилл расширение конидиеносца - вначале находят под малым увеличением, затем более детально рассматривают под средним. Пеницилл изучают под средним увеличением (объектив 40). Необходимо помнить, что плесневые грибы размножаются спорами. Поэтому препарат надо готовить вблизи предметного стекла, не допуская рассеивания спор. Препаровальные иглы по окончании работ тщательно стерилизуют над пламенем горелки.

фузариум (несовершенные грибы). Мицелий белый, розовый или желтый. От него отходят короткие ветвящиеся конидиеносцы, на концах которых располагаются конидии. Они могут быть серповидными с несколькими перегородками (макроконидии) и овальными (микрoконидии), чаще без перегородок. Хламидоспоры бывают шаровидными, грушевидными, располагаются скоплениями или цепочкой. Образуются в старых конидиеносцах, а кроме, конидиях. Воздушный мицелий хорошо развит (рис. 26).

Фузарии широко распространены в

S3



Гриб 20 Fusarium nivale

**1 - конидиеносцы.
2 - макроконидии**

природе. Многие из них вызывают порчу плодов, овощей, поражают всходы растений. У пораженных растений листья пожелтевшие, на их поверхности - серовато-розовый налет. Фузариумы, особенно при низких температурах, образуют токсины (зеараленон, Т-2 микотоксин и другие). При поедании животными и птицей пораженных растений и зерна насту паст их отравление Клинически это проявляется в угнетении, нарушении координации движений и других признаках. Микотоксин зеараленон выпивает у свиней эстрогеннзм, дегенеративные изменения яичников, матки, что приводит к бесплодию 1-2 микотоксин поражает желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистую, нервную системы, а также костный мотг. лимфатические узлы и другие органы и ткани.

Дрожжи. Это безмицелиальные одноклеточные почкующиеся грибы, относятся к классу аскомицетов. Форма клеток ратая, но чаще овальная, округлая, лимоноподобная.

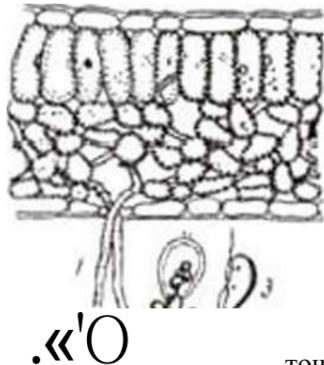
Клетки дрожжей имеют оболочку, цитоплазму и, в отличие от прокариот, оформленное ядро, которое хорошо видно в неокрашенном препарате. Цитоплазма молодых клеток более однородна, с возрастом появляются вакуоли Дрожжи крупнее бактериальных клеток, их диаметр колеблется от 10 до 15 мкм. Внутри клеток дрожжей образуются споры, после чего они становятся сумками (аскамн). Число спор - от 4 до 12. Различают еще артроспоры, или покоящиеся клетки дрожжей. Они отличаются от вегетативных форм наличием двухконтурной оболочки, большим количеством запасных питательных веществ (гликогена, жира) и отсутствием вакуолей. Размножение дрожжей происходит почкованием, спорами и половым путем (копуляцией). На поверхности материнской клетки после отделения почки остается дочерний шрам, который состоит из хитина и представляет округлое выпячивание с приподнятым ободком по периферии (рис. II).

Приготовление препаратов. Каплю культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которую готовят заранее, наносят петлей на предметное стекло. Накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Клетки дрожжей видны и при меньшем увеличении (x400), нэ для сравнения их размеров с другими микроорганизмами препарат лучше рассматривать под иммерсионной системой

Микроскопическая картина: в поле зрения микроскопа видны округлые и вытянутые клетки, среди которых встречаются и почкующиеся.

Картофельный гриб фитофтора (*Phytophthora infestans*) поражает листья, стебли и клубни картофеля (рис. 27). Споры его прорастают и образуют мицелий, который проникает внутрь тканей, преимущественно по межклетникам, и вызывает их отмирание, ткани при этом приобретают бурую окраску. Через устьица на поверхность листьев выходят воздушные гифы в виде белого пушкл. На концах воздушных нитей формируются конидии, напоминающие по форме плоды лимона с сосковидными бугорками на концах. Конидии отпадают целиком. В сырую погоду при температуре ниже 18°C в конидии образуются подвижные зооспоры, которые по-

ре двигаются во влажной среде с помощью двух жгутиков. При температуре выше 18° С конидии прорастают гифой, которая проникает в здоровые ткани листа или других



органов картофеля, вызывая заражение этой культуры

Препаровальной иглой снимают небольшое количество пушистого налета с пораженной фитофторой ткани (лучше клубня картофеля). размешивают его на предметном стекле в капле воды, накрывают покровным стеклом и рассматривают при большом увеличении микроскопа (метод раздавленной капли).

Плесневый гриб

ризопус (*Rhizopus nigricans*) - низший гриб, относится к семейству мукоровых. Мицелий ветвистый, неклеточный. плодоносящие гифы заканчиваются черными шарообразными спорангиями с эндоспорами (рис. 28).

Спорангии после созревания лопаются, и споры рассыпаются.

Споры прорастают особыми выростами - ризоидами, прикрепляются к субстрату. Проросший гриб быстро распространяется по поверхности субстрата во все стороны с помощью гиф, столонов или ризоморфов. Поражает семена зерновых культур, участвует в разрушении и порче различных плодов, овощей, хлеба и других продуктов.

Препаровальной иглой отбирают небольшое количество мицелия гриба. Готовят препарат методом раздавленной капли, рассматривают под микроскопом и зарисовывают

Рис 27 *Phytophthora infestans* I
рапорт листа картофеля с
выходящими конидиями
нижесидми. 2 - конидия
(ххкнораший), 3 - воспора 4 -
прорастающая конидия
НККИОрЛМИ

Склеротиния

Sclerotinia) поражает овощи и фрукты, образуя на них пушистый белый налет. Спора прорастает гифой, которая проникает в ткани и разрушает клетки, вызывая их гниение. Мицелий многоклеточный, споры образуются экзогенно на конидиеносцах, которые отрываются целиком. Склеротиния на овощах и фруктах образует подушечки сероватого цвета (конидиальные спорангии).

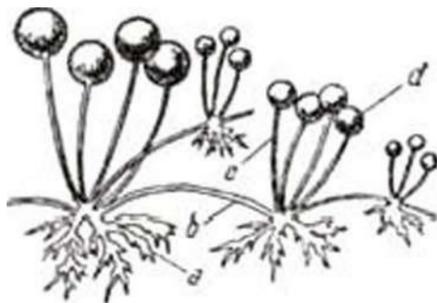


Рис 28 *Rhizopus nigricans* a - ризоиды, b - стolon, c - спорангиофор, d - спорангий

Для изучения гриба берут покрытые белым пушком плесени яблоко или моркось и иголкой снимают немного налета. Готовят препарат методом раздавленной капли и рассматривают под микроскопом. Так же, как и при рассмотрении других препаратов, диафрагма микроскопа должна

быть немного прикрыта. при этом неокрашенный препарат виден лучше. Препарат зарисовываю г.

Лучистый грибок (*Actinomyces griseus*) имеет хорошо выраженный, очень тонкий ветвящийся несентированный мицелий. Мицелий проникает в субстрат, образуя плотную пластинку, вследствие чего его трудно отделить. На поверхности субстрата образуется воздушный мицелий, который может быть пушистым или мучнистым. На гифах мицелия образуются спорангиеносцы - спиральные или прямые, одиночные или собранные в метелки. Тип спорангиеносца - хороший систематический признак для актиномицетов. Актиномицеты широко распространены в природе (почве, воде, иле), среди них встречается много видов патогенных, вызывающих актиномикоз - заболевание животных и человека. Они поселяются на семенах злаков, дают споры, которые, попадая в организм человека, вызывают заболевание.

Есть виды, образующие антибиотические вещества. Так, *Actinomyces griseus* синтезирует стрептомицин антибиотик, широко используемый в медицине.

Из чистой культуры *Actinomyces griseus* готовят препарат метолом раздавленной капли. Накрывают его покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при большом увеличении.

Для получения препарата культуру *Actinomyces griseus* надо брать вместе с кусочками питательной среды, так как отделить культуру от субстрата очень трудно. Препарат зарисовывают.

Для работы можно использовать и другие виды актиномицетов: *Actinomyces albus*, *A. bovis*, *A. citreus*, *A. chroinoagens*, *A. longisporus*. которые различаются по цвету колоний и форме спорангиеносцев.

Контрольные вопросы

1. Как происходит заражение картофеля фитофторой?
2. Какие заболевания могут вызывать некоторые виды гриба фузариум. Какое строение имеют конидии этого гриба?
3. Какова роль ризоморф > гриба рнзоиус?
4. Какое практическое значение имеют некоторые виды актиномицетов?

Тема 7. ПОЛЕЗНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Занятие // Методы изучения антагонизма у микроорганизмов

План

1. Выявление антагонизма у микробов
2. Выделение микробов-антагонистов из почвы.
3. Определение активности антибиотиков

Материалы и оборудование

1. Микроскопы с иммерсионной системой.
2. Чашки Петри.
3. Пипетки.
4. Стеклянные трубки диаметром 0.5 - 0.6 мм.
5. Микробиологические петли
6. Предметные и покровные стекла.
7. Фильтровальная бумага
8. Различные образцы свежей почвы.
9. Мясопестонный агар.
10. Стерильная вола.
11. Чистые культуры бактерий *Bacillus mycoides*, *Bac. mesentericus* и *Sarcina lutsa*.
12. Пенициллин или другой антибиотик

Основные сведения

В естественных условиях обитания микроорганизмы существуют не изолированно друг от друга, а образуют сложные сообщества (микробценозы), в которых находятся в различных взаимоотношениях. Одним из широко распространенных типов взаимоотношений микроорганизмов является антагонизм, или антагонистические взаимоотношения, при которых один микроорганизм оказывает отрицательное воздействие на другой, задерживая СГО рост или вызывая полную гибель. Достаточно развести небольшое количество почвы в воде и посеять почвенную разводку на поверхность питательного агара в чашке Петри, как там разовьется несколько колоний антагонистов, не допускающих роста окружающих микроорганизмов и поэтому образующих вокруг себя светлые зоны агара, свободного от микроорганизмов

Антагонистическое действие вызывается большей частью тем, что один организм выделяет в окружающую среду продукты своей жизнедеятельности, оказывающие тормозящее влияние на развитие другого организма вплоть до его гибели. Такие вещества различной химической природы, образующиеся в процессе жизнедеятельностиTM микроорганизмов и обладающие способностью отрицательно воздействовать на другие микроорганизмы, получили название антибиотиков, или антибиотических веществ

Химическая природа этих веществ различна, но все они обладают антибактериальным действием различного характера. Одни подавляют развитие бактерий (бактериостатическое действие), другие вызывают их полную гибель (бактерицидное действие), а третьи способны растворять клетки бактерий (бактериолитическое действие). Характерной особенностью антибиотиков является резко выраженная избирательность их по отношению к различным бактериям. Каждый антибиотик действует на определенные бактерии - только грамположительные или грамотрицательные.

Продуцентами антибиотических веществ являются многие растительные и животные организмы, но наибольшее значение имеют микроорганизмы: бактерии, актиномицеты и грибы. Микроорганизмы-антагонисты широко распространены в природе, главным образом в почве, богатой органическими веществами, откуда были выделены наиболее активные из них (например, *Actinomyces globisporus* продуцент стрептомицина). В настоящее время многие антибиотики получены в чистом виде и находят широкое применение как в медицине и ветеринарии для лечения человека и животных, так и в фитопатологии в борьбе с грибными и бактериальными болезнями культурных растений.

При изучении явления антагонизма и действия антибиотиков, выявлении антагонистических взаимоотношений микроорганизмов, выделении из почвы микробов-антагонистов для определения их антибиотической активности протзтв бактерий разработаны различные микробиологические методы разной сложности. С некоторыми наиболее простыми из них следует ознакомить будущих биологов и специалистов сельского хозяйства

Ход работы

Поставить опыты и изучить явление антагонистических взаимоотношений микроорганизмов, ознакомиться с методикой выделения микробов-антагонистов и определения активности антибиотика по отношению к бактериям - задача настоящей работы.

Опыт по выявлению антагонистических взаимоотношений. Антагонистические взаимоотношения микроорганизмов можно выявить путем посева на твердой питательной среде нескольких видов микроорганизмов-антагонистов.

В чашку Петри выливают расплавленный мясопептонный или бобо-вопептонный агар, который через несколько минут затвердевает в виде ровной пластинки. Затем на поверхность твердого питательного агара производят посев разных бактерий в двух направлениях. Например, посередине чашки делается посев широкой полосой *Bacillus mcsentericus*, а перпендикулярно к ней подсевают параллельными штрихами чистую культуру *Bac. mycooides* и *Sarcina lutca*. Засеянные чашки помещают в термостат при температуре 26...28°C и через сутки или двое производят учет результатов опыта. При этом следует обратить внимание на различие в интенсивности роста микробов в местах их соприкосновения на питательной среде. Если в этих местах рост слабый или его совсем нет, то это свидетельствует о антагонизме.

личин антагонизма между микроорганизмами и об угнетающем действии одного из них на другой. Угнетающее действие микробов-антагонистов может сказываться не только в задержке роста, но иногда и в изменении формы клетки, в чем можно убедиться, сравнивая препараты, приготовленные из зон нормального и угнетенного роста.

Опыт по выделению микробов-антагонистов из почвы При выделении антагонистов из почвы или других естественных источников применяются различные методы, из которых наиболее простым является метод прямого посева почвы.

Питательный мясопептонный или бобовопептонный агар разогревают, выливают в чашки Петри и равномерно распределяют по дну. Когда агар затвердеет, производят посев бактериями или грибами, по отношению к которым желают выделить антагонистов. Для этого петлей или пипеткой наносят каплю посевного материала и равномерно распределяют его по поверхности питательной среды стерильным стеклянным шпателем. Чашку Петри с посевом помещают в термостат при температуре 25-30°C на 1-2 суток. После этого на выросший бактериальный или грибной налет раскладывают мелкие кусочки свежей почвы. Если в почве содержатся микробы-антагонисты, то они в процессе своего развития будут тормозить рост или вызывать гибель (лизис) бактерий или грибов, а вокруг комков почвы появятся светлые участки их лизиса. Из литических участков в дальнейшем производят выделение чистых культур антагонистов.

Определение активности антибиотиков Для доказательства антибиотической активности и избирательности действия антибиотиков на микроорганизмы можно поставить такой опыт (опыт А. Флеминга). В чашке Петри с застывшим питательным агаром делают желобок, который заполняют пенициллином или культуральной жидкостью какого-либо другого антагониста. После этого производят посев культур различных бактерий в виде полосок, расположенных перпендикулярно к желобку. Раствор антибиотика диффундирует из желобка в окружающий питательный агар и препятствует росту бактерий в каждой из полосок. При этом ближайшая к желобку часть полоски каждого микроба остается прозрачной, и рост микробов начинается лишь на некотором расстоянии. Величина этой прозрачной части полоски может служить мерой активности антибиотика. Этот же опыт свидетельствует о том, что действие антибиотиков на микроорганизмы избирательно и чувствительность их неодинакова.

Более точное определение концентрации антибиотика и содержания его в жидкости может быть осуществлено чашечным методом с цилиндриками, основанным на диффузии антибиотика в окружающую питательную среду и поэтому иногда называемым методом диффузии. Сущность его состоит в следующем. В расплавленный и охлажденный до 45°C мясопептонный или бобовопептонный агар вносят петлю культуры сарцины (*Sarcina lutea*), содержимое пробирки тщательно перемешивают и выливают в чашку Петри. После того, как агар застынет, берут короткие (длиной около 1 см) стеклянные цилиндрики с внутренним диаметром 5-6 мм и ус-

танавливают их на агаре на равном расстоянии друг от друга. Для удобства погружения цилиндриков в агар их с одного конца немного нагревают на спиртовке или горелке. Одновременно готовят различные разведения пенициллина (1:1000; 1:10000; 1:50000), вносят их в открытые цилиндрики и чашку Петри, помешают в термостат. Пенициллин диффундирует из цилиндриков в окружающий агар и препятствует росту бактерий на поверхности агара. Вокруг каждого (цилиндрика) образуется светлая (стерильная) зона, в которой не наблюдается роста бактерий. Скорость проникновения антибиотика и активность его действия на бактерии пропорциональна концентрации антибиотика в цилиндриках, т. е. чем крепче раствор пенициллина, тем больше диаметр стерильной зоны

Сравнивая величину зон, полученных с раствором антибиотика неизвестной концентрации, с величиной зон со стандартным раствором того же антибиотика, определяют приближенное содержание последнего в исследуемой жидкости.

Контрольные вопросы

1. Что такое антагонизм микроорганизмов?
2. Какие типы антагонизма микробов вы знаете?
3. Как выявить антагонизм микробов?
4. Как выделить микробы-антагонисты из почвы?
5. Как определить активность антибиотиков?
6. Каково практическое значение антагонизма микробов?

Занятие 12 Микробиологический метод защиты растений.

План

1. Микроскопическое исследование бактериальных препаратов энто- бактерина, битокенбациллина, лепидоцила.
2. Микроскопическое исследование бактериального препарата бак- токумарина

Материалы и оборудование

1. Бактериальные препараты *Bac. thuringiensis* (энтобактерин, битоксибаинлин, лепилоцил), *Salmonella decumanicidum* (бактокумарин).
2. Грибной препарат *Beauveria bassiana* (бовсрин)
3. Краситель карболовый фуксин.
4. Предметные стекла.
5. Микробиологические петли.
6. Микроскопы.
7. Спиртовки.
8. Лотки.

Основные сведения Первые научные

эксперименты по использованию микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми были проведены И.И. Мечниковым, который открыл возбудителей грибных и бактериальных болезней хлебного жука в начале 80-х годов 19 века.

В настоящее время открыты и изучены многие виды бактерий, грибов и вирусов, на основе которых разработаны и производятся препараты для биологической защиты растений от болезней, вредителей и мышевидных грызунов.

Против возбудителей болезней используются грибы-паразиты второго порядка (сверхпаразиты):

•против ржавчинных грибов грибы родов *Darluca* и *Tuberculina*; •против мучнисторосяных грибов - род *Cicinobolus*; •против возбудителей болезни увядания растений (*Verticillium. Fuwium*) - род *Trichoderma*

В борьбе с вредными насекомыми используются вирусы, бактерии, энтомофторовые и энтомофильные гриба.

Вирусы ядерного и цитоплазматического полидрозов. а также гранулеза обнаружены у 200 видов насекомых-вредителей. Они только изучаются в экспериментах, препараты для использования в производстве еще не разработаны.

Бактерии выделены из погибших насекомых, они вызывают инфекционные болезни у жуков (*Bac. ropilliac*). огневка, шелкопрядов, кукурузного мотылька, яблоневой плодовой гнили (*Bac. cereus*). Наиболее широкий спектр действия у бактерий *Bac thuringiensis*. Этот вид имеет несколько разновидностей, на основе которых разработаны и производятся в промышленных масштабах биопрепараты Это бактерия, образующая кристаллы (эндотоксин) и три экзотоксина нуклеотидной и ферментной природы.

Энтобактерин - препарат на основе *Bac. thuringiensis var. gallgias* (рис. 29). Эффективен против 50 видов листогрызущих вредителей овощных, плодовых, садово-парковых и лесных насаждений.

Дендро(мци.пиш4 - препарат на основе *Bac. thuringiensis var. dendro- limus*. Эффективен против огневка, пядениц, златогузки, капустной моли и белянки, ряда вредных чешуекрылых - вредителей сада.

Битоксибацитлин - препарат *Bac. thuringiensis var.alesti* - против колорадского жука, боярышницы, кольчатого шелкопряда и др.

Грибы относятся к группе энтомопатогенных, т.е. вызывающих инфекционные болезни насекомых. Наиболее изучены следующие. Энтомофторовые грибы класса *Zygomycetes*, представители 3 родов: *Entomophthora*, *Massaspora*, *Tarichium*. Они поражают различные виды насекомых, некоторые виды клещей и пауков.

Порядок гифомицетам класса *Deuteromycetes** включает как фитопатогенные виды (род *Monilia*). так и энтомопатогенные. К последним относят представителей родов *Cephalosporin*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* и

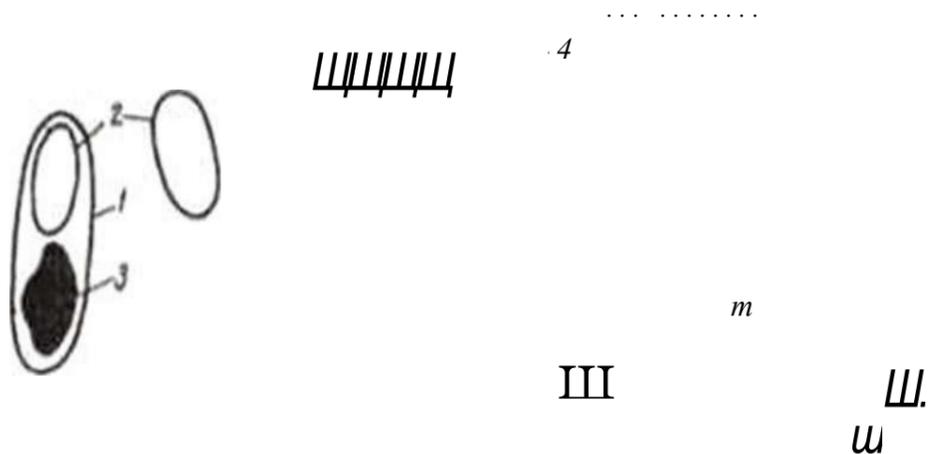


Рис. 30. *Bacillus thuringiensis* var. *alters*: 1 - бактериальная клетка в фазе роста; 2 - спора; 3 - эндотоксин в виде кристаллического включения; 4 - бактериальные клетки в фаге соевом масле.

Beauveria. К последнему роду относится *Beauveria bassiana* (рис. 30) - наиболее изученный вид, вызывающий болезнь мускардина, на основе которого разработан и широко применяется* в производстве препарат *боверин*, поражающий 60 видов насекомых и ряд клещей, в том числе таких, как клоп-черепашка, колорадский жук, свекловичный долгоносик, яблонная моль и плодовая жук, луговой и кукурузный мотыльки, совки и др.

Для борьбы с мышевидными грызунами используются бактерии рода *Salmonella*, вызывающие брюшной тиф у мышей, крыс, полевок и др. Наиболее изученными являются *S. typhi* *sputnikorum* (бактерия Мережковского), *S. dismanicidum* (бактерия Исаченко), *S. typhimurida rodentia* (бактерия №5170 Прохорова), *S. Dany&z* (бактерия Данича), а также бактерии №295 и ВК2С.

Разработаны и применяются в производстве препараты бактороденцид (на основе бактерии Мережковского) и бактокумарин (бактерии № 5170 Прохорова).

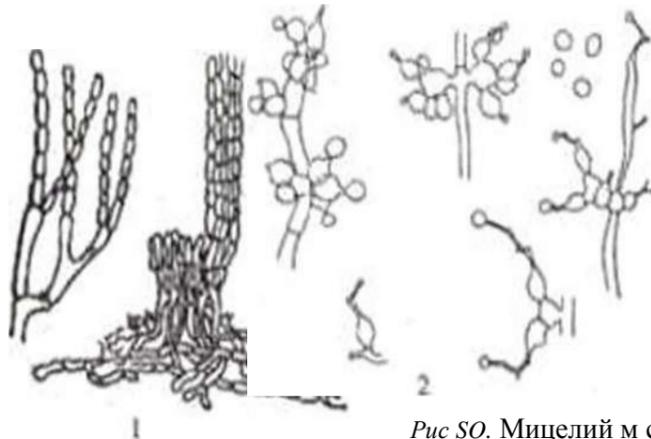


Рис. 30. Мицелий и споры гриба *Beauveria bassiana*: 1 - мицелий и конидиоспоры; 2 - конидиоспоры.

Ход работы

Приготовить фиксированный препарат имеющихся в наличии биологических средств защиты растений (этиобактерин, денлробаиллин, биток-сибациллин, боверин, бактокумарин и др.). Обнаружить споры бактерий и грибов, наполнитель (тальк), зарисовать

Контрольные вопросы

1. Экологическая роль биологического метода защиты растений
2. Краткая история разработки бномстода.
3. Охарактеризовать основные виды бактерий, грибов и вирусов, применяемых в борьбе с вредными насекомыми.
4. Охарактеризовать микробиологический метод борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений.
5. Охарактеризовать микробиологический метод борьбы с мышевидными грызунами.

I

Тема 8. ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ *Занятие 15* Изучение некоторых иммунологических реакций

План

1. Произвести дифференциацию фитопатогенных бактерий постановкой пластинчатой (капельной) реакции агглютинации на стекле.
2. Поставить капельную реакцию агглютинации с соком, полученным из листьев больного растения или клубня картофеля.
3. Поставить реакцию преципитации из Анализированных белков растений.

Материалы и оборудование

1. Свежие листья растений, зараженных вирусом.
2. Клубни картофеля, зараженного вирусом X.
3. Соковыжималка или пинцет Пиана
4. Стерильные салфетки, смоченные физиологическим раствором (в чашках Петри).
5. Предметные стекла.
6. Имунная и нормальная сыворотки.
7. Физиологический раствор в пробирках.
8. Преципитационные пробирки.
9. Раствор диализованных белков растения.
10. Взвесь фитопатогенных бактерий в физиологическом растворе (3 культуры).

Оаимны? сведения Иммунитет - это совокупность защитных механизмов, обеспечивающих сохранение постоянства внутренней среды и функций макроорганизма при вторжении и распространении болезнетворных микроорганизмов. их токсинов или других ~~сужеродных~~ чужеродных тел белковой природы.

Еще в древности было известно, что люди, перенесшие ту или иную инфекционную болезнь, в течение определенного времени оказываются невосприимчивыми к повторному заражению теми же бактериями или вирусами. Организм приобретает активную специфическую устойчивость к данной инфекции. Это происходит благодаря появлению в переболевшем организме специфических антител против данного возбудителя заболевания

Впоследствии было выявлено, что антитела накапливаются в организме и при искусственном введении в него ослабленных или убитых возбудителей инфекционных заболеваний или продуктов их жизнедеятельности.

Антитела представляют собой белки, принадлежащие к группе γ -глобулинов. По своей химической структуре и свойствам они идентичны «нормальным» глобулинам сыворотки крови. Происхождение антител и механизм их образования - одна из самых трудных проблем в иммунологии. До сих пор не найдено ее удовлетворительного решения. Считают, что антитела образуются в фагоцитирующих клетках ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), к которым относится большинство клеток селезенки, лимфатических узлов и костного мозга, клетки эндотелия печени, легких, кожи и других органов.

Специфические антитела образуются и накапливаются в результате раздражения клеток лимфоидной ткани РЭС антигенами, естественно проникшими (при заболевании) или искусственно введенными (при иммунизации) в организм. Накапливаясь в организме, они защищают его от возбудителя инфекции и ликвидируют болезнетворное начало.

Антигенами называют такие вещества, которые при парентеральном введении (минуя желудочно-кишечный тракт) в организм животного или человека вызывают образование специфических антител. Антигенами могут быть как возбудители инфекционных заболеваний или продукты их жизнедеятельности, так и совершенно безвредные вещества, чаще всего белковой или полисахаридной природы. Вне организма (в пробирке) антитела способны вступать в реакцию специфического взаимодействия с антигенами и вызывать их осаждение - преципитацию, склеивание - агглютинацию, растворение - лизис или нейтрализацию токсинов

Все реакции взаимодействия «антиген - антитело» основаны на соединении антигена с гомологичным специфическим антителом. В качестве источника антител используют сыворотку крови многократно иммунизированных (гипериммунизированных) животных, чаще всего кроликов. Сыворотки крови, содержащие специфические антитела, называются иммунными. Способность к специфическому взаимодействию между антителом

и ли пи сном используется в лабораторной практике для диагностики инфекционных заболеваний людей, животных и растений. Чаще всего для этих целей используют реакции прсинпитации и агглютинации.

Реакция преципитации заключается в изменении дисперсности коллоидов антигена (растворимого белка) и их осаждении пол влиянием специфических антител, находящихся в иммунной сыворотке Коллоидные частицы, образующиеся в результате взаимодействия антител с соответствующим антигеном, обычно электрически нейтральны и соединяются в крупные конгломераты В результат* этого коллоид становится нестойким и в пробирке появляется видимый невооруженным глазом непрозрачный беловато-матовый осадок (рис. 31).



Рис 31. Реакция ко.илдспрсимпкщни

Реакция исключительно специфична и чувствительна. С ее помощью можно уловить минимальное количество белка и даже его следы, далеко не всегда определяемые химическими методами. Кроме того, эта реакция позволяет определить природу белка.

Реакция агглютинации. Агглютинацией называется склеивание микробных клеток под влиянием антител - агглютининов, содержащихся в сыворотке крови, и образование хлопков или комков. Это очень специфическая реакция. В организме животного агглютинация не всегда вызы-

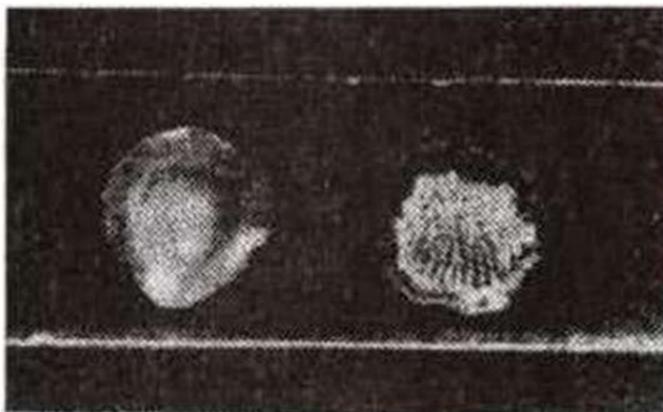


Рис 32 Реакция омл. ютим* ими ни предметном стеклс
слсм - отрицательная. справа - положительная

вадет гибель микробов. Однако, собирая их группами, облегчает лейкоцитам «охоту» на них. Лейкоцитам и другим фагоцитирующим клеткам во много раз легче захватить склеенные вместе бактерии, чем фагоцитировать их по отдельности. Кроме того, агглютинины, по-видимому, вызывают опсонизацию (подготовку к перевариванию) поверхности бактерий, что облегчает фагоцитоз.

Реакция агглютинации применяется к тем же целям, что и реакция преципитации. По технике постановки различают несколько разновидностей реакции агглютинации: пробирочную, пластинчатую, капельную (рис. 32).

Иммунологические реакции высоко чувствительны и специфичны. Однако специфичность их не абсолютна, так как существуют групповые реакции, зависящие от способности различных, но близких по своему химическому составу антигенов вступать в реакцию с одной и той же иммунной сывороткой.

Все иммунологические реакции протекают только в присутствии электролитов, например 0,85-процентного раствора хлористого натрия. Различают две фазы в течении иммунологических реакций

1) специфическая фаза, когда антитело адсорбируется на поверхности антигена. Эта фаза протекает при повышенной температуре, но остается невидимой, так как внешнего эффекта не дает, 2) неспецифическая фаза, которая протекает аналогично коллоидным процессам: происходит растворение, склеивание или осаждение антигена. Протекает она медленно и лучше всего выявляется через 12-18 ч. при температуре 4-6°C. В зависимости от внешнего проявления процесса взаимодействия антигена с антигеном можно увидеть невооруженным глазом осаждение антигена, выпадение его в осадок или лизис клеток.

Иммунологические реакции применяют с двумя целями:

а) для выявления антител в сыворотке больного при помощи реакции с заведомо известным антигеном (диагностиком);

б) для обнаружения и исследуемом материале специфического антигена при помощи реакции с заведомо известной иммунной сывороткой.

Вследствие более простой организации у растений (по сравнению с животными) процессы развития инфекции и механизм устойчивости (иммунитета) у них проще, чем у животных и человека. Врачи обычно говорят о врожденном и приобретенном (в результате перенесенного заболевания или вакцинации) иммунитете. Напряженность приобретенного иммунитета обычно очень высокая и обусловлена накоплением антител.

Совершенно иное положение отмечается в растительном мире. Здесь также имеет место явление естественной (врожденной) невосприимчивости, проявляющейся на довольно высоком уровне. У растений наблюдается также и приобретенная невосприимчивость к возбудителям инфекций. Но случаи приобретенного иммунитета у растений более редки, чем у животных. а главное - приобретенная невосприимчивость у растений ничего общего не имеет с иммунитетом животных, она проявляется лишь в течение

короткого срока и только на участках, близко соприкасающихся с местом иммунизации. Поэтому для защиты растений от болезней практическое значение имеет не искусственно приобретенный иммунитет, а присущий растительным тканям врожденный естественный иммунитет. Он вырабатывается в ходе длительной эволюции или же создается в результате селекции,

Естественный иммунитет растений основан на способности живой клетки синтезировать в ответ на инфекцию защитные вещества. Эти вещества называют по-разному: фитоалексинами, фитонцидами, антибиотическими или фунготоксическими соединениями. Химическая природа и механизм действия этих веществ еще недостаточно изучены. В отличие от антител, все защитные вещества, которые удалось выделить из растений, оказались небелковой природы. Они принадлежат к сложным циклическим соединениям и не имеют ничего общего с антителами животных.

Все микроорганизмы-возбудители болезней растений (вирусы, бактерии, грибы) представляют собой полноценные антигены. При иммунизации ими животных удается получить иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела. В настоящее время получены сыворотки ко многим грибам, бактериям и особенно вирусам, вызывающим инфекционные заболевания растений. Такие сыворотки широко используются в фитопатологии, селекции и семеноводстве. Они применяются для ранней диагностики грибковых, бактериальных и вирусных заболеваний растений, в целях дифференциальной диагностики возбудителей, вызывающих сходные симптомы заболеваний, для отбора здоровых, устойчивых к заболеванию растений при селекционной работе и для определения устойчивости растений к заболеваниям.

Все эти многочисленные задачи решаются проведением различных серологических реакций между антителами сывороток и антигенами. В качестве антигенов при постановке реакций используют или чистые культуры возбудителей заболеваний, или сок растений, подозреваемых в заболевании, или анализированные белки растительных тканей. В работе с растениями чаще всего применяются реакции преципитации и реакции агглютинации.

Ход работы

Методические указания Для дифференциации фитопатогенных бактерий по реакции агглютинации студентам выдаются разведенные нормальная и иммунная сыворотки, специфичные к одному из возбудителей бактериоза растений. В качестве антигена выдают три пробирки со взвесью фитопатогенных бактерий в физиологическом растворе. В одной из пробирок находится возбудитель, на который получена иммунная сыворотка. Пробирки с сыворотками и культурами нумеруются.

Техника постановки капельной реакции агглютинации На три предметных стекла наносят пастеровской пипеткой по капле иммунной сыворотки. Капли наносят ближе к одному из концов стекла. На второй конец

67

стекла из пастеровской пипетки капают каплю нормальной сыворотки. Стекла с каплями нумеруют. Пастеровской пипеткой набирают взвесь фитопатогенных бактерий из пробирки и капают по I капле в нормальную и иммунную сыворотки. Номер вносимой культуры должен соответствовать номеру предметного стекла с сывороткой. Сыворотки и внесенную взвесь бактерий хорошо перемешивают бактериологической петлей или, проше, углом чистого предметного стекла. Наблюдения ведут в течение 5-10 мин.

При совпадении антигена к антителу и капле смеси (сыворотка + антиген) через несколько минут появляются зернышки или хлопья, жидкость в капле светлеет. Следовательно, реакция положительная. Если внесенный антиген не соответствует

содержащимся в сыворотке агглютинам. то капля остается равномерно мутной, как в каплях с нормальной сывороткой.

Для постановки диагноза на вирусное заболевание вегетирующего растения ставят капельную агглютинацию с его соком.

Антиген получают из листьев свежего растения или из клубней проросшего картофеля. Для этого свежие листья сворачивают плотным жгутом, а картофель нарезают мелкими кусочками и заворачивают в стерильную салфетку из трех слоев марли. Салфетку перед употреблением смачивают стерильным физиологическим раствором и слегка отжимают. Салфетку с листьями или картофелем перекручивают и сдавливают пинцетом Пирсона или соковыжималкой. Появившийся сок собирают в пробирку или наносят в виде капли на предметное стекло. К капле сока на предметном стекле добавляют каплю иммунной сыворотки, содержащей антитела к предполагаемому возбудителю болезни. Углом предметного стекла хорошо перемешивают капли. Если в соке растения содержится антиген, соответствующий антителам сыворотки, то в капле появляются хлопья, а жидкость светлеет. В капле с нормальной сывороткой или при отсутствии в растении соответствующего вируса жидкость остается равномерно мутной.

Образование видимого осадка при смешивании растительных соков, содержащих вирус, с их антисывороткой обычно классифицируется как реакция преципитации. Однако, если капля неочищенного растительного сока, содержащего вирус, смешивается с антисывороткой то происходит склеивание мелких частиц материала растения-хозяина. Явление это можно наблюдать невооруженным глазом или через микроскоп при малом увеличении. Хотя в этом случае в реакцию не вовлекаются антитела, специфичные к веществам растения, тем не менее, указанный процесс называют реакцией агглютинации (по-видимому, из-за внешнего сходства выпадающего осадка) со специфической агглютинацией бактерий под действием противобактериальной антисыворотки.

Реакция преципитации Для определения устойчивости растений к инфекционному заболеванию селекционерами широко используется серологический метод, предложенный Т. И. Федотовой (1935). По этому методу ставят реакцию пробирочной кольцепреципитации иммунной сыворотки, полученной на определенном возбудителе, с раствором диализата белка исследуемого растения. Агглютинация, содержащаяся в иммунной сыворотке-

кс. при встрече с белком восприимчивого сорта растения лакгт положи- тельную реакцию преципитации. Белок сыворотки и белок антигена, соединяясь, образуют пилимое невооруженным глазом кольцо преципитата на границе жидкостей. Это означает, что белок восприимчивого сорта серологически родствен с антигеном, используемым для иммунизации животного, т. е. с белком возбудителя болезни. Отрицательная реакция указывает на устойчивость сорта ист серологического родства между белком возбудителя болезни и белком исследуемого сорта растения. Точного объяснения существующей родства между белками растения-хозяина и микроба-паразита нет. Предполагают, однако, что восприимчивые сорта, обеспечивая возбудителя болезни питанием, влияли на состав и строение белков этого паразита. Эта принятая пища оказывает определенное влияние на создаваемые организмом специфические белки, что и улавливается реакцией иммунитета.

Техника постановки реакции коагценпреципитации Для постановки реакции преципитации требуется:

1) иммунная сыворотка к предполагаемому возбудителю заболевания; 2) антиген Анализированный белок растения; 3) физиологический раствор; 4) тонкие пастеровские пипетки; 5) преципитационные пробирки диаметром 3-5 мм; 6) штативы к пробиркам.

Сыворотки, антиген и физиологический раствор должны быть совершенно прозрачными.

В узкие пропилы анионные пробирки, установленные в штативе, наливают пастеровской пипеткой по 0,5мл преципитирующей сыворотки, разведенной физиологическим раствором 1 : 2 По стенке наклоненной пробирки осторожно тонкой пастеровской пипеткой наслаивают на сыворотку 0.5мл белкового диализата растений, разведенного последовательно до нужной концентрации (1 : 2; 1 : 4 и т. д.). Пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят в штатив. При хорошем наслаивании отчетливо бывает заметна граница соприкосновения сыворотки с антигеном.

При наличии в диализате (восприимчивое растение) специфического преципитиногена, а в сыворотке - антител к нему, на границе жидкостей появляется дымчатое кольцо (диск) выпавшего преципитата. Кольцо должно возникнуть и специфических случаях в течение 5-10 мин. после наслаивания жидкостей. Диагностическую оценку ведут на черном фоне в проходящем свете

При постановке этой реакции для исключения неспецифической преципитации обязательно ставят следующие контроля:

- 1) преципитирующая сыворотка физиологический раствор;
- 2) нормальная сыворотка + исследуемый антиген;
- 3) преципитирующая сыворотка (заведомо) + специфический антиген.

В двух первые пробирках контроля реакция должна быть отрицательной.

Контрольные вопросы:

1. Что такое инфекции и иммунитет?
2. Какие виды иммунитета вы знаете?
3. Что такое антигены и антитела?
4. Какие реакции иммунитета вы знаете?
5. Как провести реакцию преципитации?
6. Как провести реакцию агглютинации?

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение I

Приготовление наиболее употребительных* красок и реактивов

Для окраски микроорганизмов применяют насыщенные растворы красителей, которые готовятся по указанным ниже рецептам

Метиленовый синий. Насыщенный спиртовой раствор этого красителя можно приготовить впрок. Для этого к 100 мл спирта добавляют 3 г сухого красителя. Для окрашивания фиксированных препаратов метиленовый синий используют в концентрации 1:40 (1 мл насыщенного спиртового раствора смешивают с 40 мл лигнифицированной воды).

Фуксин основной. Для приготовления насыщенного спиртового раствора к 100 мл спирта добавляют 10 г сухого красителя. Краску разбавляют в пропорциях 1:10, 1:100.

Карболовый фуксин Циля. К 100 мл 50-процентного раствора (фенола (карболовой кислоты) добавляют 100 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина. Через 24 ч краску фильтруют. Карболовый фуксин Циля хорошо красит споры и поэтому применяется наиболее часто. Для окраски вегетативных клеток применяют раствор, разбавленный в 5-10 раз дистиллированной водой (разбавленный раствор быстро портится).

Карболовый гениановый фиолетовый (для окраски по Граму) 1 г генианового фиолетового растворяют в 10 мл спирта. Полученный раствор выливают в 100 мл 50-процентного раствора фенола (карболовой кислоты). Добавляют по каплям спирт до исчезновения с поверхности металлической блестящей пленки.

Карболовый иритрин для окрашивания бактерий почвы. Для приготовления рабочего раствора в 100 мл дистиллированной воды растворяют 5 г фенола (карболовой кислоты) и 1-5 г иритрина. После этого добавляют жидкости отстаивать.

Для окраски ключевых включений применяют следующие реактивы

Раствор Дюго-Хя

а) для окраски гранул: 2 г йодида калия растворяют в 5 мл воды, затем прибавляют 1 г йода и объем доводят водой до 300 мл;

б) XI* окраски глицигена: 20 г йодида калия растворяют в 100 мл воды, затем прибавляют 7 г кристаллического йода.

Краска Судана III для окраски жира к 100 мл 90-процентного спирта добавляют 0.5 г красителя.

Метиленовый синий для окраски водных культур применяют в концентрации 1:40, готовят из спиртового насыщенного раствора.

Для негативной окраски конул: одну часть обыкновенной туши разбавляют в 10 раз. Раствор кипятят, фильтруют и хранят в холодном месте.

Раствор нигроина для обнаружения капсул к 100 мл дистиллированной воды добавляют 10 г нигроина, раствор кипятят в течение 30 мин. добавляют 0.5 мл формальдегида и хранят в темноте.

Реактив Грисеа для обнаружения азотистой кислоты. Готовят для раствора

Р I C I R o p I смешивают 14,7 г ледяной уксусной кислоты, 1 г сульфаниловой кислоты и 15 мл 1% лигнифицированной воды, смесь нагревают до растворения реактивов, охлаждают и приливают 270 мл воды.

Раствор 2: смешивают 0.2 г нафтамина, 14.3 г ледяной уксусной кислоты и 25 мл дистиллированной воды, нагревают до растворения и приливают 100 мл воды

Через употребление оба раствора смешивают в равных объемах

Раствор дифениламина для обнаружения азотной кислоты Несколько кристаллов дифениламина растворяют в 1 мл концентрированной серной кислоты Кликке исследуемой культуральной жидкости прибавляют каплю этого раствора, при наличии азотной кислоты проявляется синее окрашивание

Реактив Нессера для обнаружения аммиака Раствор хлорида ртути (II) (17 г в 300 мл воды) приливают к раствору Поликалия (35 г в 100 мл воды) до выпадения красного нерастворимого осадка. Объем полученной жидкости доводят до 1 л, добавляя 20-процентный раствор едкого щелочи. Если при этом осадок растворился, то снова добавляют раствор хлорида ртути (II) до получения осадка Светло-желтый раствор хранят в герметично закрытой склянке По мере обесцвечивания окраски раствора к нему добавляют небольшие порции хлорида ртути (II)

Примочение чернил для письма по стеклу 1 г фуксина основного растворяют в 15 мл спирта, 2 г таннина растворяют в 15 мл воды и кипятят Оба раствора смешивают в равных объемах

Примочение баритовой «обм» для обнаружения оксида углерода (IV) 10 г шлроксда бария растворяют в 100 мл дистиллированной воды, взбалтывают 15 мин, дают отстояться раствору в течение суток, затем осторожно сливают прозрачный раствор в чистую колбу, доливают 90 мл дистиллированной воды, переливать раствор в чистую колбу лучше через сифонную трубку, колбу необходимо плотно закрыть пробкой

Работа с микроскопическими препаратами

Препараты микроорганизмов готовят на предметных стеклах В одних случаях ючают живые микроорганизмы «прижизненно». в других - их убивают, фиксируют Методы приготовления прижизненных и фиксированных препаратов описаны в соответствующих работах Во всех случаях стекла должны быть совершенно чистыми и обезжиренными Перед работой их промывают* водой и протирают смесью, состоящей из равных частей спирта и эфира Можно выдерживать предметные стекла в этой смеси 2-3 дня

Предметные стекла, бывшие в употреблении, опускают на 2 часа в хромовую смесь. затем хорошо промывают водой и КИПЯТ в 2-процентном растворе соды После кипячения стекла вновь промывают в проточной воде и сушат

Препараты не рекомендуется класть на стол, нужно иметь специально приготовленные для этого штативы Такой штатив можно сделать из двух стеклянных палочек и двух резиновых трубок Стеклянные палочки длиной 15-20 см дугообразно соединяют друг с другом с двух сторон с помощью резиновых трубок Расстояние между трубками 4-5 см. т.е. меньше длины предметного стекла

Такой штатив кладут на эмалированную ванночку или кристаллизатор и на него (поперек) укладывают предметные стекла При приготовлении постоянных препаратов с применением окраски после окрашивания их промывают водой прямо на штативах Такое приспособление ускоряет и облегчает работу

Чтобы рабочее место во время занятий было чистым, рекомендуется все краски, реактивы, пинетки и другое оборудование держать на лотках или подставках.

Если нет предметных стекол с вышлифованными углублениями для изучения микроорганизмов методом висючей капли, надо сделать из картона кольца или квадратики площадью 4 см² с круглым отверстием посередине диаметром несколько меньше размера покровного стекла и наклеить их на предметные стекла

Наиболее удачные и интересные фиксированные препараты, полученные на занятиях. рекомендуется сохранять, составив из них музейный демонстрационный материал.

Чтобы фиксированный и окрашенный препарат сохранить надолго, можно покровное стекло по краям обмазать канадским бальзамом или покрыть сверху раствором плексигласа. Капля жидкого плексигласа наносится на сухой препарат растекаясь по его поверхности и высыхая, она образует тонкую, прозрачную, твердую пленку, надежно защищающую материал от повреждений. Пленка не мешает рассмотрению препарата под микроскопом, даже с иммерсией. Жидкий плексиглас готовят путем растворения 1 г плексигласа в 100 мл дихлорэтана; после растворения получается довольно густая масса, быстро застывающая. На предметное стекло с фиксированным препаратом с одной стороны приклеивается этикетка с наименованием вида микроорганизмов и датой приготовления. Готовые препараты сохраняют в специальных банках или коробках. Такие препараты могут служить учебным пособием для занятий. Если позволяет время, то приготовление постоянных препаратов можно включить в программу практических занятий студентов.

Приложение I

Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

Стерилизуемый материал	Метод стерилизации	Режим стерилизации	Примечания
Питательные среды с почвенной вытяжкой картофельные среды	автоклавирование	1,5-2 атм 30 мин	в колбах, пробирках, бутылках и т.д. закрытых ватными пробками
Жидкие и агаризованные среды, не содержащие Сахаров и других веществ, разлетающихся при 120°C	автоклавиование	1 атм 20 мин	так же
Жидкие и агаризованные среды с сахарам и и другими соединениями, не выдерживающими 120°C	автоглавирование	0,5 атм 15-20 мин 1	так же
Среды или компоненты сред, не выдерживающие названия выше	дробная стерилизация	текучий пар 3 раза по 30-40 мин	так же
Среды или компоненты сред, не выдерживающие названия выше	фильтрование через бактериальные фильтры		
Чашки Петри, пипетки, шпатели	горячим воздухом	165-170°C. 2ч	завернутые в бумагу (отверстия пипеток закрыты ватными тампонами)
Колбы, пробирки, химические стаканы, флаконы, стеклянные центрифужные пробирки, трубки Буркит"	горячим воздухом	165-170°C. 2 ч	закрытыми ватными пробками
Держатели бактериальных фильтров, резиновые пробки и штанги, фильтры Зейтца, свечи Шамберлана и Баркефельда	автоклавиование	1 атм 20 мин	завернутые в бумагу
Мембранные фильтры	автоклавирование	0.5 атм 15 мин	в сосуде с дистиллированной водой можно стерилизовать длительным кипячением
Пробирки, изготовленные из термостойких пластмасс	ультрафиолетовыми лучами	время экспозиции устанавливается экспериментально	пробирки после облучения хранят в стерильной посуде

СПИСОК латинских названий микроорганизмов

- Acetobacter aceti 31,36.40
- pasteurianum 31,36.40
- xylinum 31,36.40,41 Achromobacter stut./cri 9 Actinomyces albus 56
- griseus 56

- bovis 56
- globisporus 58
- citreus 56
- chromogencus 56
- longisporus 56 Ascomycetes 52
- Aspergillus 40.61
- niger 53
- flavus 53
- fumigatus 53
- oryzae 53
- Azotobacter agilis 44
- chroococcum 15, 18, 19, 20, 21, 43,44,49
- vinelandii 44

- Bac. idosus 25
- maximus buccalis 14
- mesentericus 6, 7,9, 11, 16, 17, 25, 44, 58, 59
- megaterium 19, 44
- mycoides 9, 12, 16,19, 20, 25,44, 58, 59
- putrificus 18,44
- cellulosa methanica 35
- cellulosa hydrogenica 35 • creus 61
- popilliae 61
- subtilis 6, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 25, 44,45, 48 • thuringiensis 60,61,63
- Var. alesti 61 Var. gallinarum 61,62 Var. dendrolimus 61
- Bact. marcescens (Serratia marcescens) 44, 45, 49
- xanthochlorum schuster 50, 51, 53 Basidiomycetes 52
- Beauveria bassiana 60, 62 Bezzia mirabilis 11,13
- Bejerinkia 44 Candida 41 Cellulocaulis 35
- viridis 40 Cellulobacterium 35, 40 Cellulomonas 61
- Cephalosporium 61 Clostridium omelianskii 35, 39
- pasteurianum 11, 16, 18, 38, 43
- *amylobacter 15,17
- pectinovorum 35, 39
- felsinum 35,39 Chytridiomycetes 52
- Chromobacterium denitrificans 19 Crenothrix polyspora 9, 14, 15 Cytophaga 35,40
- Chytridiomycetes 52

- Darcula 61
- Deuteromycetes 52,61 Derxia 44

- Entomophthora 61 Escherichia coli 12, 34

Fungi imperfecti 52 Fusarium 40, 61
 Fusarium nivale 50, 54

Granulobacter pectinovorum 11
 Galionella ferruginca 14

Lactobacillus bulgaricum 34, 37
 - lactis 34, 37
 - plantarum 34,38
 - brassicum 38
 - fermenti 34, 38 Lactobacterium
 acidophilum 37 Leuconostoc
 mesenteroides 20 Leptothrix ochracea 14

Massaspora 61
 Micrococcus aurantiacus 9, 11, 14, 20
 - denitrificans 43, 50 Monilia 61
 Mucor mucedo 52
 Nitrobacter 43, 45, 46, 49, 50 Nitrosomonas sp. 19,
 20, 43, 45, 46, 50

Oidium lactis 38 Oomycetes 52

Paccilomyces 61
 Proteus vulgaris 6, 7, 12, 44, 48, Pseudomonas
 aeruginosa 43
 - fluorescens 9, 43, 50
 - stutzeri 43, 50 Phytophthora infestans 54

Rhizobium 44
 Rhizopus nigricans 50, 55, 56 Rhodospirillum
 rubrum 13

Saccharomyces cerevisiae 15, 16, 17, 18, 19, 54
 - kefirii 37 Salmonella 62
 - Danysz 62
 - decumanicum 60, 62
 - typhimurida rodentia 62
 - typhi spermophilorum 62 Sarcina lutea 58, 59, 60
 - flava 10, 14
 - ureae 9, 11
 Serratia marcescens 45, 48 Spirochaeta buccalis 9, 13,
 14
 - dentium 13, 14 Streptococcus albus 13, 14
 - lactis 9, 34, 37 Sclerotinia 50, 55 Sorangium 35, 40
 Sporocytophaga 35, 40

Tarichium 61 Tuberculina 61 Treponema pallidum
13 Trichoderma 61
Vibrio buccalis 9. 13. 15 Verticillium 61
Zygomycetes 52, 61

Список использованной литературы

1. Аникнев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. - М.: Просвещение, 1977. - 128 с.
 2. Леонов Н.Р. Микробиология. - М.: Колос, 1980. - 312 с.
 3. Леонов Н.Р. Практикум по микробиологии. - М.: Лгпромпромиздат. 1988 - 155 с.
 4. Бондаренко Н.В. Биологическая защита растений. - Л.: Колос. 1978.-256 С.
 5. Васильева З.В., Кириллова Т.А. Лабораторные работы по микробиологии. - М.: Просвещение. 1979. - 79 с.
 6. Воробьев А.А., Кривошсннк Ю.С., Быков А.С. и др. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. - М.: Мастерство. 2001. - 221 с.
 7. Ежов Г.И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. - М.: Высшая школа. 1981. -271 с.
 8. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. - М.: Просвещение, 1987.- 191 с.
 9. Прохоров М.И. Микробиологический метод борьбы с вредными грызунами.-Л.: Колос, 1966.- 171 с.
 10. Теппер Е.З., Шилькова В.К., Персверзева Г.И. Практикум по микробиологии. - М.: Колос. 1979. - 216 с.
- И.Хнжняк П.А., Бегляров Г.А., Статнвский В.Г., Никифоров А.М. Химическая и биологическая защита растений. — М.: Колос. 1971.-215 с.

*Редактор А.Е. в Лбраиот Компширин scptiKa If A Ганннкй,
Е. Н. Гунчарьи*

Подписано в печать 2\ М.2003. Формат 60/84/16 Усл. ил 4.5У Тираж 100 эт, Шла№ 207. Оригинал-маркет
подготовлен и тиражирован в издательстве Белгородского государственного университета 308015 г
Белгород, ул. Победы, 85