

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Вятский государственный университет»  
Биологический факультет  
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию  
в учебном процессе  
протокол заседания кафедры  
№ \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_  
Заведующий кафедрой,  
доктор медицинских наук, профессор  
\_\_\_\_\_ И.В. Дармов

И.В.МАРАКУЛИН, И.Г.ШИРОКИХ

## **СПЕЦГЛАВЫ МИКРОБИОЛОГИИ**

**Лабораторный практикум**

Киров 2011

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки

**Маракулин, И.В., Широких, И.Г.**

Спецглавы микробиологии. Лабораторный практикум: учебно-методическое пособие / И.В.Маракулин, И.Г. Широких – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 59 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Спецглавы микробиологии».

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
Правила оформления лабораторных работ.....	4
Порядок проведения занятий .....	5
Техника безопасности .....	6
Тема №1: «Методы изучения биохимических признаков бактерий. Идентификация микроорганизмов с помощью биохимических тест систем» .....	7
Тема №2: «Правила работы с бактериофагами. Качественные пробы для обнаружения бактериофагов. Определение титра бактериофагов».....	23
Тема №3: «Определение антагонистической активности микроорганизмов. Бактериоциногенез. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам» .....	26
Тема №4: «Влияние физических (влажность, свет, температура) и химических (анисептики, кислотность) факторов на рост микроорганизмов»....	29
Тема №5: «Летальное действие ультрафиолетовых лучей на клетки бактерий <i>E.coli</i> .».....	31
Тема №6: «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам».....	33
Тема №7: «Получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий» .....	41
Тема №8: «Получение накопительных культур микроорганизмов, разрушающих целлюлозу (клетчатку)» .....	44
Тема №9: «Получение накопительных культур денитрифицирующих бактерий» .....	49
Тема №10: «Получение накопительной культуры микроорганизмов аммонификаторов» .....	53
Тема №11: «Обнаружение свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов» .....	56

## **ВВЕДЕНИЕ**

Лабораторный практикум по курсу «Микробиология (спецглавы)» предназначен для студентов 3 курса университета, обучающихся по направлению 020400.62 «Биология» по программе бакалавриата.

Особенность предлагаемого курса состоит в том, что он является вводным по отношению ко всем остальным биологическим дисциплинам. При его освоении студенты должны опираться на знания, полученные при обучении в средних учебных заведениях и на предшествующих курсах обучения. Основой практикума является изучение основных механизмов обмена веществ и преобразования энергии у анаэробных и аэробных микроорганизмов, типов брожения, фотосинтеза, взаимоотношений микроорганизмов и окружающей среды, действия на микроорганизмы биологических и химических факторов, понимания микроорганизмов как биогеохимических объектов.

Важное место в практикуме занимает освоение практических приемов изучения биохимических свойств микроорганизмов, приёмов работы с бактериофагами, определения антагонистической активности микроорганизмов, микробиологических методов исследования объектов окружающей среды, изучение влияния физических и химических факторов на микроорганизмы, получение накопительных и чистых культур разных видов микроорганизмов.

Практикум предполагает самостоятельную подготовку студентов к каждому занятию. Вопросы для самоподготовки приведены в начале соответствующей темы. Контроль знаний студентов осуществляется путем письменного решения тестовых заданий и устного собеседования с преподавателем по каждой теме.

## **ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ОТЧЕТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ**

Лабораторные работы следует оформлять на отдельных листах формата А4. В верхней части страницы необходимо указать номер и название темы, цели занятия; ниже должны быть представлены все материалы, которые перечислены в конце каждой темы (схемы, таблицы, зарисовки и т.д.).

Зарисовки являются необходимым элементом изучения живого объекта; они нужны, чтобы лучше понять и закрепить в памяти культурально-морфологические и тинкториальные особенности разных видов микроорганизмов, выращенных в жидких и на плотных питательных средах, микроорганизмов, увиденных в микроскопических препаратах в световом микроскопе.

Над каждым рисунком необходимо указать номер и название работы и воспроизвести содержание надписи, которое приведено в тексте каждого задания.

При выполнении зарисовок необходимо пользоваться простым и несколькими цветными карандашами.

Поскольку рисование на занятиях по биологии не самоцель, а метод изучения объекта, при зарисовке необходимо соблюдать следующие правила:

1. Рисовать только на одной стороне листа, т.к. рисунки, сделанные на обеих сторонах, накладываются друг на друга и со временем портятся.

2. Рисунок должен быть крупным, детали хорошо различимыми. На одной странице не следует помещать более 2-3 рисунков простых объектов. Если объект сложный и крупный, то делают только один рисунок на странице.

3. Главное требование к рисунку – правильное отображение формы, соотношения размеров (длины, ширины и высоты) отдельных частей и целого объекта.

4. Правильное отображение соотношения частей изучаемого микроорганизма позволит выполнить и другое требование – показать индивидуальные особенности объекта, т.е. зарисовать не абстрактную, а конкретную колонию, выросших на питательном агаре микроорганизмов, детальное отображение увиденного в микроскопическом препарате и т.д. Это очень важно, т.к. приучает будущего специалиста к наблюдательности, учит видеть наряду с общим индивидуальное.

5. Вокруг рисунка не нужно рисовать контуры поля зрения микроскопа.

6. На каждом рисунке обязательно должны быть сделаны обозначения его отдельных частей. Надписи выполняются следующим способом: напротив отдельных частей объекта надо поставить стрелки и рядом с каждой написать название. Все надписи должны быть расположены параллельно друг другу.

7. Будьте внимательны: при изучении очередной темы должны быть выполнены и отражены все без исключения задания, указанные в практикуме. Только после этого работа предьявляется преподавателю для проверки.

## **ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЗАНЯТИЯ**

1. Введение – 5 минут.

2. Письменный контроль исходного уровня знаний (решение тестовых заданий) – 15 минут.

3. Собеседование по вопросам самоподготовки и коррекция знаний – 45 минут.
4. Самостоятельная работа – 110 минут.
5. Подведение итогов занятия – 3 минуты.
6. Сбор отчетов (альбомов) для проверки преподавателем – 2 минуты.

### **ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ**

При выполнении лабораторных работ необходимо неукоснительно соблюдать общепринятые правила безопасного обращения с кислотами и щелочами, лабораторной стеклянной посудой (предметными и покровными стеклами, пипетками, чашками Петри, пробирками и др.), колющими и режущими инструментами (скальпелями, препаровальными иглами и др.), электрооборудованием (осветителями); соблюдать осторожность при использовании открытого огня (спиртовки); не допускать пролива и возгорания легко воспламеняющихся жидкостей (этилового спирта, эфира).

**МОДУЛЬ 1 «ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ У АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. ТИПЫ БРОЖЕНИЯ. ФОТОСИНТЕЗ.»**

**Лабораторная работа № 1.1 и 1.2**

**ТЕМА №1: «МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ БАКТЕРИЙ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ»**

**ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

Физиолого-биохимические особенности жизнедеятельности микроорганизмов играют большую РОЛЬ для их правильной идентификации и оценки свойств. В основе большинства физиолого-биохимических процессов, происходящих в клетке (питания, дыхания, размножения), лежит действие разнообразных ферментов. По характеру связи с цитоплазматическими структурами и по месту проявления своего действия ферменты делятся на внутри- и внеклеточные. Каждый вид микроорганизмов продуцирует постоянный для него набор ферментов, одни из которых расщепляют в разной степени белки, жиры, углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Стабильность ферментативных систем бактерий позволяет использовать их биохимические свойства в сочетании с морфологическими, культуральными и другими постоянными признаками для определения их видов и типов.

Биохимическая характеристика микроорганизмов начинается при применении селективных и дифференциально-диагностических сред для первичного посева. Рост на чашке Петри с различными средами позволяет выделить колонии, дающему гемолиз на кровяном агаре, колонии микробов, обладающих лецитиназной активностью, на желточно-солевой среде, наконец, разделить бактерии, расщепляющие и не расщепляющие лактозу на дифференциально-диагностических средах для микробов семейства кишечных. Таким образом, уже при первичном выделении культуры учитывают и отмечают, в записях ее ферментативные особенности. Дальнейшие изучения ведут на питательных средах, специально подобранных для этой цели. Известно, что микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма. Чтобы выяснить возможность развития бактерий за счет тех или

иных углеродсодержащих веществ, культуру высевают на среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. Из углеводов и многоатомных спиртов испытывают, как правило, следующие соединения: арабинозу, ксилозу, рамнозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, сорбозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу, рафинозу, декстрин, крахмал, инсулин, целлюлозу, глицерин, эритрит, маннит, дульцит, сорбит, инозит, салицин.

Часто оказывается достаточным определения ферментов, расщепляющих углеводы, чтобы получить ясную биохимическую характеристику культуры, но иногда этого недостаточно для выявления принадлежности микробов к той или иной таксономической группе. Тогда в изучение включают другие биохимические реакции на наличие специфических ферментов или продуктов обмена. Так, для кишечных бактерий - это исследование на наличие декарбоксилазы, дезаминазы или дегидролазы аминокислот, у протеев следует определять протеазу, у коринебактерий - уреазу и цистиназу и т.д.

## 1. СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ЗАНЯТИЯ

### Цели занятия:

- ознакомиться с основными методами изучения биохимических признаков бактерий;
- освоить технику определения сахаролитических ферментов у микроорганизмов разных видов с помощью "пестрого" ряда Гисса;
- ознакомиться с методами анализа образования внеклеточных ферментов и оценки амилалитической, протеолитической и липолитической активности у микроорганизмов;
- ознакомиться с методами обнаружения аммиака, сероводорода, индола и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

### Материалы и оборудование

Лабораторная посуда (стерильные чашки Петри, пипетки, флаконы, бактериологические петли). Плотные элективные и дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина, Плоскирева и др. Спиртовки, термостат, пробирки со средами Гисса. Наглядные пособия по теме занятия. Культуры микроорганизмов: *Sarcina lutea*, *Escherichia coli* M-17, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces cerevisiae*.

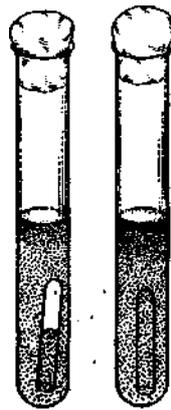
## Ход работы

### 1.1. Определение сахаролитических ферментов и возможности использования микроорганизмами соединений углерода

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру, бактерий высевают в питательные среды Гисса, называемые также "пестрым" рядом. Короткий "пестрый" ряд Гисса содержит обычно 5 пробирок-со средами, содержащими один из следующих углеводов: глюкозу, лактозу, маннит, мальтозу и сахарозу. При более углубленном исследовании биохимических свойств выделяемых микробов "пестрый" ряд дополняют за счет пробирок с другими углеводами: дульцитом, сорбитом, арабиновой и др.

Название "пестрый" ряд обусловлено тем, что под действием фермента микроба одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и, соответственно, меняют цвет питательной среды.

Среды Гисса бывают жидкими, полужидкими (с добавлением 0,2-0,5% агара) и плотными (с добавлением 1,5-2,5% агара). В пробирки с жидкими средами Гисса для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, опускают поплавок - трубочку диаметром 0,5-0,7 см, запаянную с одного конца (рисунок 1).



- 1 - рост культуры сопровождается образованием газа;  
2 - газ не образуется

Рисунок 1 - Накопление газа в поплавке

Поплавок помещают запаянным концом кверху; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в поплавке, вследствие чего у его запаянного конца собирается пузырек газа ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  или др.).

Для выявления газообразных продуктов, образующихся в жидкой среде при культивировании микроорганизмов, вместо поплавков можно пользоваться поролоновой губкой. Ее нарезают кубиками такой величины, чтобы, находясь в пробирке, они не касались ее стенок. Кусочки поролона опускают в питательную среду до ее стерилизации. При автоклавировании пузырьки газа из пор губки вытесняются паром и после остывания заполняются питательной средой, в связи с чем губка опускается на дно пробирки. Если в среде, засеянной микроорганизмами, образуется газ, он задерживается в порах губки, которая всплывает на поверхность среды. При этом в ткани поролона видны образующиеся пузырьки газа.

В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности.

### **Основные стандартные прописи и подготовка сред для "пестрого" ряда**

*Цветные среды Гисса с углеводами.* К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0,5 г хлорида натрия. Пептон и соль растворяют при нагревании воды в течение нескольких минут, фильтруют через бумажный фильтр так, чтобы раствор был прозрачным, устанавливают  $\text{pH}=7,0-7,4$ , прибавляют 0,5-1,0 г одного из необходимых углеводов (лактоза, глюкоза, сахароза, маннит и т.д.), а затем индикатор Андрее в количестве 1 мл на 100 мл среды или 0,1 мл 1,6%-ного индикатора бромтимолового синего. Готовую среду разливают по 3 мл в пробирки, простерилизованные вместе с поплавками и расположенными запаянным концом кверху. Среду стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 или 20 минут при температуре  $112^\circ\text{C}$ . Во время стерилизации поплавки заполняются доверху питательной средой. Основной сред, применяемых для определения ферментации углеводов, является пептонная вода. Мясной бульон для этой цели непригоден, т.к. он содержит различные углеводы, что может привести к получению неправильных, результатов. Среды Гисса с индикатором Андрее имеют желтый цвет, с индикатором бромтимоловым синим - зеленый ( $\text{pH}=7,0-7,2$ ). В результате роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углевода с образованием кислых продук-

тов распада, цвет среды изменяется: в первом случае она приобретает ярко-розовый цвет, во втором - желтый.

*Среды Гисса с сывороткой крови.* К готовым средам Гисса добавляют 10-30% стерильной лошадиной сыворотки. Для контроля сыворотки ее выдерживают в течение 3 дней в термостате.

*Среды Гисса на сыворотке.* Стерильную лошадиную сыворотку разводят стерильной дистиллированной водой (1:5), прогревают в текуче-паровом режиме при 100°C в течение 30 минут, прибавляют 0,5% углерода (глюкоза, мальтоза или сахароза), устанавливают рН=7,6 и прибавляют 1 мл 1%-ного водного раствора кислого фуксина на 100 мл среды, разливают по пробиркам и стерилизуют при температуре 100°C 3 дня подряд в течение 10 минут. Приготовленная среда почти бесцветна. Перед употреблением ее выдерживают для проверки на стерильность в термостате в течение 2 суток. При расщеплении углеводов с образованием кислоты среда краснеет и сыворотка свертывается. Срок наблюдения над изменением среды - 2-3 суток.

*Среды Гисса с крахмалом.* Обычный картофельный крахмал в количестве 25 г несколько раз промывают теплой дистиллированной водой для удаления растворимых частиц. Затем заваривают в 500 мл горячей дистиллированной воды и отстаивают. Надосадочный слой крахмальной воды сливают для дальнейшего использования. Отдельно готовят пептонно-сывороточную воду: растворяют 5 г пептона и 1 г двузамещенного фосфата натрия в 1250 мл дистиллированной воды, добавляют 250 мл лошадиной сыворотки, устанавливают рН=7,6. Крахмальную воду (325 мл) смешивают с 1250 мл пептонно-сывороточной воды, к смеси прибавляют 40 мл и 0,02%-ного спиртового раствора фенолового красного и все кипятят в водяной бане в течение часа, затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 минут. Приготовленная среда имеет насыщенно розовый цвет, Результаты ферментации крахмала учитывает через 3 суток после произведенного засева культуры. При расщеплении крахмала цвет среды изменяется в желтый и она свертывается.

В зависимости от физиологических особенностей микроорганизмов можно применять иной состав фона для сред Гисса, Так, например, для коринеподобных бактерий рекомендуется такая фоновая среда (г/л):

пептон - 3.0, NaCl - 2.5; для актиномицетов:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 5,6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -1.0, раствора микроэлементов - 0.1 мл агара - 5.0, воды дистиллированной - до 1 л;

Раствор микроэлементов на 100 мл дистиллированной воды включает (в г):

$\text{SnSO}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0.64,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.11,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0.79,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.15. Раствор готовят отдельно и хранят при температуре 3-5°C.

Углеводы и многоатомные спирты готовят в виде 10%-ных водных растворов и стерилизуют обычно отдельно от основного фона среды автоклавированием при 0.5 ати, фильтрованием или дробно текущим паром. Раздельная стерилизация рекомендуется в связи с тем, что сахара в присутствии фосфатов и других компонентов среды частично разрушаются и образуют соединения, токсичные для микроорганизмов.

Способность микроорганизмов использовать углеводы к многоатомные спирты в процессе жизнедеятельности можно определять и на плотных средах. В этом случае стерильный раствор углевода или спирта добавляют в стерильную агаризованную расплавленную среду, тщательно перемешивают ее и разливают в стерильные пробирки или чашки Петри. В первом случае пробирки скашивают и используют одну пробирку для засева одной культуры. Во второй, после того, как агар застынет, дно чашки Петри с наружной стороны делят на секторы карандашом по стеклу и затем каждую из исследуемых культур микроорганизмов высевают петлей, проводя радиальный штрих (рисунок 2).

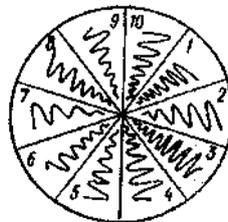


Рисунок 2. Схема посева на плотную среду различных микроорганизмов (1, 2, 3, ..., 10) для определения способности утилизировать углеводы

В качестве источника углерода многие микроорганизмы способны использовать и такие химические устойчивые соединения, как углеводороды. Выявить способность исследуемой культуры окислить жидкие нелетучие углеводороды можно на плотней среде состава (г/л):  $\text{KHNO}_3$  - 4.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  - 1.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - С.8, выщелоченный агар - 2.0, pH=7.2. Среду стерилизуют при 1 эти и разливают в чашки Петри толстым слоем. После того, как среда застынет, в центре агаровой пластинки вырезают лунку. Для этого можно воспользоваться пробоотбойником любого типа или пробочным сверлом (диаметр 8-10 мм), которые предварительно стерилизу-

ют в пламени горелки. Микроорганизмы высевают радиальными штрихами от лунки к периферии чашки (рисунок 3).

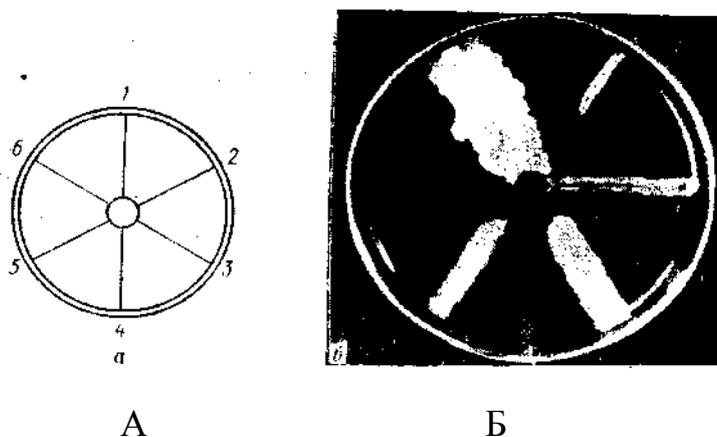


Рисунок 3 - Определение способности микроорганизмов использовать углеводороды: А - схема посева, 1-6 – штрихи посева различных микроорганизмов, в центре – лунка с жидким углеводородом; Б – рост различных культур

В лунку вносят 2-3 капли исследуемого углеводорода. Чашки помещают в термостат строго горизонтально, не переворачивая. Через 7-10 суток отмечают наличие или отсутствие роста по штриху в сравнении с контролем – ростом на среде без углеводорода.

## **1.2. Определение протеолитических ферментов, образования аммиака, индола и сероводорода, возможности использования микроорганизмами соединений азота и их отношение к кислороду**

Большинство гетеротрофных микроорганизмов может усваивать азот органических соединений, например, пептонов и белков. При этом многие виды микроорганизмов продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты – протеазы, катализирующие расщепление белков.

В результате ферментативного расщепления молекулы белка образуются высокомолекулярные промежуточные продукты гидролиза – пептоны, альбумозы, полипептиды, аминокислоты, которые используются клеткой непосредственно в процессе биосинтеза, а также подвергаются расщеплению в результате дыхания или брожения до более простых соединений. Поэтому разложение белка микроорганизмами (амонификация) всегда сопровождается образованием побочных продуктов: аммиака, который выделяется при дезаминировании аминокислот, сероводорода, который освобождается при раз-

рушении серусодержащих аминокислот (цистина, цистеина, метионина), а также индола, который образуется при распаде триптофана. Обнаружение этих продуктов в культурах свидетельствует об использовании аминокислот микроорганизмами. Процесс аммонификации всегда сопровождается - повышением щелочности среды.

Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру микроба засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок. Чаще всего для этой цели применяют желатин, реже - свернутую лошадиную сыворотку, коагулированный яичный белок, молоко или кусочки вареного мяса.

Протеолитическая активность одного и того же микроба при определении ее на разных питательных средах будет проявляться неодинаково, что обусловлено специфичностью ферментов. Поэтому для равных видов микробов рекомендуют питательные среды различного состава.

**Протеолиз желатины.** Культуру высевают с пробирки с мясо-пептонной-желатиной (МПЖ), которую готовят следующим образом. К мясо-пептонному бульону (МПБ) прибавляют мелко нарезанную желатину из расчета 10-15 г на 100 мл. Желатине дают набухнуть в течение 20-30 минут, затем смесь нагревают на водяной бане, доведенной до 40-45<sup>0</sup>С, до полного растворения желатины. Устанавливают рН 7.0, прибавляя к расплавленной желатине 10%-ный раствор бикарбоната натрия (при более щелочной реакции желатин застывает плохо). Затем среду разливают в пробирки по 5-8 мл так, чтобы не намочить края и верхнюю часть пробирки, соприкасающуюся с пробкой. Стерилизацию среды производят дробно в течение 3 дней по часу при температуре 100<sup>0</sup>С или однократно при 110<sup>0</sup>С в течение 20 минут. После стерилизации среду охлаждают в строго вертикальном положении, чтобы верхняя часть столбика при гелеобразовании (застудневании) оставалась совершенно ровной. Посев производят уколом, погружая петлю с исследуемой культурой в глубь питательной среды до дна пробирки. Пробирки, в которые посеяны культуры микробов, способных расти при 20-25<sup>0</sup>С, оставляют при комнатной температуре. Остальные посева инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят одну или две пробирки с незасеянной желатиной для контроля. При температуре 37<sup>0</sup>С желатина плавится, поэтому после инкубации пробирки, вынутые из термостата, опускают в холодную воду или ставят в холодильник. После застывания желатины в контрольных пробирках приступают к просмотру роста и учету изменений в питательной среде опытных пробирок. Там, где под действием фермента желатиназы произошло расщепление белков желатины, отмечается

визуальное разжижение питательной среды. Если желатина разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения - послойное, воронкообразное, мешковидное и т.д. (рисунок 4).

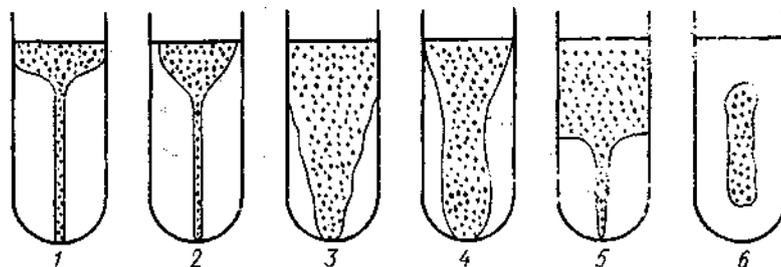


Рисунок 4 - Схема разжижения желатины микроорганизмами при посеве уколом: 1 - кратеровидное, 2 - реповидное, 3 – воронкообразное, 4 - мешковидное, 5 - послойное, 6 – пузырьвидное; 1-3 и 5 – разжижение вызвано аэробами, 4 - факультативными анаэробами, 6 - анаэробами облигатными

Пробирки, в которых после суточного инкубирования среда остается без изменений, оставляют в термостате. Наблюдения за изменением среды ведется в течение 10 суток. В протоколе исследования обязательно отмечают день проявления признаков разжижения среды, степень и характер разжижения.

**Протеолиз казеина на молочном агаре Эйкмана.** Для выявления этой способности к 10 мл стерильного расплавленного на водяной бане мясо-пептонного агара добавляют, соблюдая правила асептики, 2,5-3 мл снятого стерильного молока. Перед приготовлением среды молоко обезжиривают центрифугированием в течение 15 минут при 2000-3000 об/мин с удалением толстой поверхностной пленки и стерилизуют при 0,5 ати в течение 20 минут. Полученную среду разливают в чашки Петри. Среду используют без дополнительной стерилизации, т.к. совместная стерилизация молока с агаром неприменима вследствие свертывания казеина с образованием хлопьев. Бактерии высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросших по штриху микроорганизмов. Особенно четко она видна после обработки среды раствором 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Зону гидролиза казеина измеряют в мм от края штриха или колонии до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше казеинолитическая активность бактерий.

**Протеолиз куриного яичного белка.** В пробирку со стерильным мясо-пептонным бульоном нейтральной реакции прибавляют, соблюдая правила

асептики, кусочки вареного яичного белка в форме кубиков с гранями 5-8 мм, Предварительно белок куриного яйца нарезают в стерильной посуде и стерилизуют в течение 20 минут при 120<sup>0</sup>С. С помощью бактериологической петли в пробирку вносят культуру микроорганизма. Посевы просматривают ежедневно в течение 5 дней. Протеолитически активные культуры расщепляют коагулированный яичный белок: кусочки белка, содержащиеся в среде, заметно уменьшаются в размере, превращаясь в крошкообразную массу, или полностью растворяются.

Некоторые микроорганизмы с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: индола, сероводорода, аммиака.

*Обнаружение аммиака.* Способность микроорганизмов образовывать аммиак выявляют при их росте в мясо-пептонном бульоне. Для этого МПБ разливают в пробирки по 5-8 мл в каждую и стерилизуют при 1 ати. После посева под ватно-марлевой пробкой укрепляют узкую стерильную полоску лакмусовой бумаги так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. Пробку рекомендуется заворачивать целлофаном, чтобы затруднить улетучивание аммиака. При образовании аммиака красный лакмус синееет,

*Обнаружение сероводорода.* Выявление способности продуцировать сероводород, основано на реакции образования сульфидов металлов. Наиболее распространенный способ - проба с уксуснокислым свинцом. Микроорганизмы выращивают в МПБ, содержащем и 0.01% цистина и цистеина, или в бульоне Хоттингера. Тотчас после посева исследуемых микроорганизмов в пробирку вносят и размещают под средой полоску фильтровальной бумаги, пропитанную насыщенным раствором уксуснокислого свинца, укрепив ее под ватно-марлевой пробкой (рисунок 5).

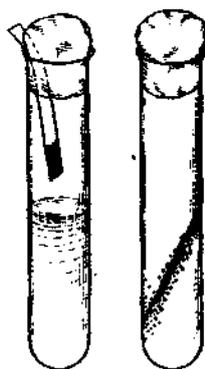


Рисунок 5 - Обнаружение сероводорода, образуемого микроорганизмами: 1 - почернение индикаторной бумаги с уксуснокислым свинцом, 2 - образование сульфида железа FeS в толще среды

Пробку пробирки заворачивает в целлофан, чтобы затруднить улетучивание сероводорода. Продолжительность культивирования 7-10 суток. В положительных случаях образующийся в культуре сероводород вступает с бесцветным ацетатом свинца и превращается в сульфат свинца, который придает бумаге черно-бурое окрашивание. Более четкие результаты наблюдаются при использовании среды следующего состава (г/л)- пептон - 10.0, NaCl - 5.0, цитрат  $\text{NH}_4\text{Fe}$  - 0.3, агар -15.0, дрожжевой автолизат - 2 мл, вода водопроводная, pH 7.0. Среду разливают в пробирки, стерилизуют при 0.5 ати, после стерилизации скашивают и делают посев штрихом. При развитии микроорганизмов на данной среде о выделении сероводорода судят по почернению среды вследствие образования сульфида железа FeS (рис. 5).

*Обнаружение индола.* Индол обнаруживают по качественной реакции с реактивом Эрлиха, состоящего из пара-диметиламино-бензальдегида (1 г), 96°-ного этанола (95 мл), концентрированной соляной кислоты (10 мл). Для выявления индола можно использовать различные среды: МПБ с 0.01% триптофана, 1%-ную казеиновую воду (г/100 мл: казеин -1.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0.2, NaCl - 0.3) или 2-3%-ную пептонную воду (г/100 мл:- пептон - 2.5, E,о,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0.2, NaCl - 0.3, pH среды 7.2-7.4). Среды разливают в пробирки по 8-10 мл, стерилизуют при 1 ати и засевают суспензией бактерий. Через 5-7 суток проводят качественную реакцию на присутствие индола в культуре и в контроле - стерильной среде. Для этого на поверхность среды, не перемешивая, вносят 1-2 мл реактива Эрлиха; появление красной окраски свидетельствует об образовании индола.

*Отношение к кислороду.* По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на 4 группы: облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы. Чтобы судить о принадлежности микроорганизма к той или иной группе, микробную суспензию высевают в пробирки с расплавленной и остуженной до 40-45°C агаризованной питательной средой. Посев проводить уколом (рис.6). Строгие аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое. Микроаэрофилы - на некотором расстоянии от поверхности. Факультативные анаэробы обычно развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

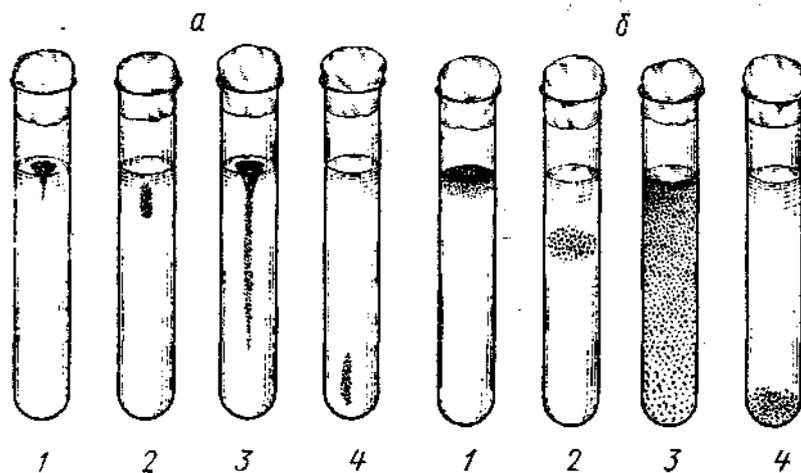


Рисунок 6 – Рост микроорганизмов при посеве уколом (а) и при посеве в расплавленную плотную среду (б): 1 – аэробы, 2 - микроаэрофилы, 3 - факультативные анаэробы, 4 - облигатные анаэробы

Факультативные анаэробы достаточно хорошо растут и в аэробных, и в анаэробных условиях. В анаэробных условиях многие из них способны использовать в качестве конечного акцептора электронов не кислород, а нитраты. В ходе этого процесса, называемого денитрификацией, или нитритным дыханием, нитраты восстанавливаются до нитритов и далее до газообразного азота. Другие факультативные анаэробы могут в анаэробных условиях переключаться с дыхания на брожение, и тогда в средах с углеводами накапливаются значительные количества органических кислот.

*Способность к денитрификации* определяют на среде следующего состава (г/л): глицерин - 10.0, дрожжевой экстракт - 5.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2.0,  $\text{KNO}_3$  - 10.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,025,  $\text{NaCl}$  - 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0.001, агар - 1.0, Среду разливают в пробирки по 5 и 10 мл и стерилизуют при 0.5 ати. Исследуемую культуру вначале сеют в пробирки с 5 мл среды (1-ый пассаж). Посев делают уколом. Через 24 часа петлю культуры 1-го пассажа переносят

в пробирки с 10 мл среды, которую предварительно расплавляют и охлаждают до 40-45°C. После внесения бактерий среду перемешивают, остужают и заливают 2-3 мл стерильного 1%-ного водного агара для создания анаэробных условий. Развитие бактерий, способных к денитрификации, сопровождается помутнением среды и выделением газа. Проверить способность бактерий к восстановлению нитратов можно и на МПБ, к которому добавляют 0.2%  $\text{KNO}_3$ . Среду разливают в пробирки, опускают на дно каждой поплавок и стерилизуют при 1 ати. Посев проводят суспензией клеток. Продолжительность культивирования - 2-5 суток. По окончании опыта отмечают накопление в поплавке газа ( $\text{N}_2$ ) и определяют качественными реакциями присутствие в культуральной жидкости нитратов и нитритов.

*Реакция на нитраты с дифениламином.* На фарфоровую пластинку переносят каплю концентрированной серной кислоты, помещают в нее несколько кристаллов дифениламина и после его растворения добавляют каплю исследуемой жидкости. При наличии ионов  $\text{NO}_3^-$  жидкость окрашивается в темно-синий цвет. Следует иметь в виду, что азотистая кислота также дает с дифениламином синее окрашивание. Поэтому пробу на нитраты можно проводить только при отсутствии в среде нитритов.

*Крахмал-йодная реакция на нитриты.* Реакция основана на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, присутствие которого хорошо обнаруживают крахмалом. Для проведения реакции к капле культуральной жидкости добавляют каплю раствора, содержащего на 100  $\text{H}_2\text{O}$   $\text{ZnCl}_2$  - 2.0 г,  $\text{KI}$  - 0.4 г, крахмал - 0.4 г, каплю 20%-ного раствора  $\text{HCl}$ . При наличии в среде нитритов появляется синее окрашивание.

*Реакция на нитриты с реактивом Грисса.* Реакция основана на образовании в кислой среде в присутствии нитритов и ароматических аминов (сульфофеноловой кислоты и  $\alpha$ -нафтиламина) азосоединения, окрашенного в красно-розовый цвет. Реактив Грисса готовят *ex tempore*, смешивая равные объемы заранее приготовленных растворов 1 и 2.

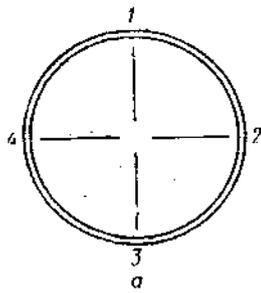
**Раствор 1.** 0.5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты. Добавляют 100 мл дистиллированной воды и фильтруют. Раствор устойчив в течение месяца.

**Раствор 2.** 0,1 г  $\alpha$ -нафтиламина растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Остужают и добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор  $\alpha$ -нафтиламина фильтруют и хранят не более недели. Для выполнения реакции к капле реактива Грисса добавляют каплю культуральной жидкости. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии нитритов. Параллельно проводят реакции со стерильной средой.

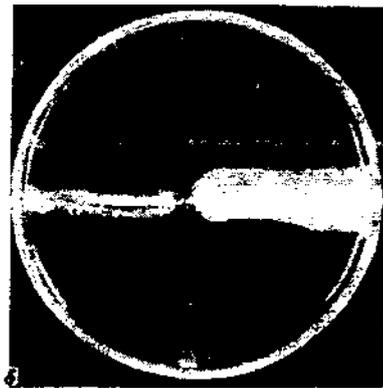
### 1.3. Определение внеклеточных ферментов, обладающих амилолитической и липолитической активностью

Микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов самые различные высокомолекулярные соединения. Однако макромолекулы не могут проникать через мембрану клетки. Они подвергаются гидролизу, который осуществляется под воздействием экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Большинство из них катализирует гидролиз полимеров до полного растворения продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди представителей различных групп микроорганизмов. При поиске продуцентов ферментов-гидролаз в лабораторной практике применяют специальные методы. Сущность состоит в следующем. Микроорганизмы выращивают на агаризованной среде, содержащей макромолекулярный субстрат. Если клетки выделяют в среду экзоферменты, то выросшие колонии окружены зоной, в которой обнаруживаются продукты гидролиза. Определение протеолитической активности (ферментов-протеаз) было описано выше.

**Амилолитическая активность.** Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, активными продуцентами которых являются различные виды бацилл, псевдомонад, стрептомицетов и мицелиальных грибов. Для выявления амилолитической активности используют среду следующего состава (г/л): пептон - 10.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 5.0, растворимый крахмал - 2.0, агар - 15.0, pH среды 6.8-7.0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет исследуемые бактерии высевают по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки агаровой пластинки раствором Люголя (йод кристаллический - 1 г, калий йодистый - 2 г, вода дистиллированная - 300 мл). Для этого на поверхность среды наливают 3-5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизовался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряют до границы светлой зоны. Чем больше размер светлой зоны, тем выше амилолитическая активность (рисунок 7).



А



Б

Рисунок 7 - Определение амилалитической активности: А – схема посева: 1-4 - штрихи разных культур; Б - среда с культурами после обработки раствором Люголя

**Липолитическая активность.** Липиды подвергаются гидролитическому разложению под действием липаз. Продуценты липаз обнаруживаются среди дрожжей, мицелиальных грибов, бактерий рода *Clostridium* и других групп микроорганизмов. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы высевают на среду, содержащую соответствующий липид. Определенная трудность при постановке таких опытов связана с тем, что жиры не смешиваются с водой. Поэтому чаще всего вместо жиров в среду вводят твины - эфиры жирных кислот и сорбита. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60 - стеариновую, а твин-80 - олеиновую кислоты. Твины хорошо растворимы в воде и имеют нейтральную реакцию. Состав среды (г/л): твин - 10.0, пептон - 10.0, NaCl - 5.0, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O - 0.1, агар - 20.0, pH среды - 7.4. Готовят среду без твина и стерилизуют ее при 1 ати. Водный раствор твина соответствующей концентрации стерилизуют отдельно при 0.5 ати и добавляют к стерильной основной среде. Среду разливают в чашки Петри. Когда агар застынет, на поверхность агаровой пластинки высевают штрихом или уколом исследуемый микроорганизм. Засеянные чашки Петри выдерживают при соответствующей температуре необходимое для роста микроорганизма время. На наличие липазы указывает образование вокруг штриха или колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных от твина.

#### 2.4. Определение вида бактерий по Ленису

Для описания физиологических и биохимических признаков определяемый микроорганизм из чистой культуры, соблюдая стерильность, засевают в

6 пробирок с диагностическими питательными средами: 1 - МПБ, 2 - прямой, 3 - МПА скошенный, 4 – МПЖ, 5 - молоко, 6 - косяки картофеля. В пробирки 2 и 4 микроорганизмы пересевают уколом, а остальные – петлей. Посевы помещают в термостат при температуре 25-28°C, исключая пробирку с МПЖ (4), которую оставляют при комнатной температуре (не выше 24°C).

Через 2-5 суток приступают к определению рода и вида изучаемых бактерий, пользуясь определителем или таблицей, пригодной для определения бактерии из воздушной среды.

## Лабораторная работа № 1.3 и 1.4

### ТЕМА №2: «ПРАВИЛА РАБОТЫ С БАКТЕРИОФАГАМИ. КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРОБЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА БАКТЕРИОФАГОВ»

#### Цель занятия:

- познакомиться с правилами работы с бактериофагами и техникой обнаружения бактериофагов в жидкой питательной среде по Уварову и на плотной питательной среде с помощью методов Отто и Грациа;
- оценить концентрацию (титр) бактериофага в исследуемом материале по методу Аппельмана.

#### Материалы и оборудование

Лабораторная посуда и вспомогательное оборудование: стерильные чашки Петри, пипетки, пробирки, флаконы, бактериальные петли, плотные питательные агаровые среды в чашках Петри, питательный бульон, спиртовки, термостат, штативы для пробирками для приготовления разведений, микропипетки, позволяющие дозировать объем жидкости до 50 мкл.

Культуры микроорганизмов: *E. coli* М-17, вирулентный бактериофаг *E. coli*.

#### Ход работы

##### Обнаружение бактериофага из исследуемого материала с использованием жидкой питательной среды (по Уварову)

1. Приготовить по 5 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* М-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности.
2. Внести в две пробирки с 4,5 мл питательного бульона по 0,5 мл стандартной бактериальной культуры *E. coli* М-17, которая является гомологичной к искомому фагу.
3. Взять 2 г исследуемого материала (почвы) и суспендировать в 5 мл питательного бульона. Получить 1,0-2,0 мл фильтрата с использованием стандартных мембранных фильтров с размером пор  $< 1$  мкм. (Использовать фильтр, изготовленный в виде шприцевой насадки).
4. Внести в одну из засеянных культурой кишечной палочки пробирок 0,2 мл полученного фильтрата исследуемого материала. Вторая пробирка, содержащая питательную среду, засеянную культурой кишечной палочки, является контролем.

5. Обе пробирки помещают в термостат при 37°C через 24 часа учитывают результат. При учете результатов (по Уварову) возможны следующие варианты:

А.) Содержимое опытного сосуда прозрачно, в контроле - помутнение питательной среды. Полученные данные указывает на содержание в исследуемом фильтрате бактериофага высокой активности.

Б.) В опытном сосуде имеется менее выраженное по сравнению с контролем помутнение среды. Это свидетельствует о содержании в исследуемом материале бактериофага средней активности.

В.) При одинаковом помутнении в обоих сосудах для окончательного заключения об отсутствии **бактериофага** необходимо произвести дополнительное исследование по методам Отто и Грациа.

### **Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах по методу Отто**

1. В эксперименте используется плотная питательная среда с содержанием не более 1,5% агара (более высокая концентрация агара угнетает развитие негативных колоний бактериофага). Питательную среду засевают 0,1 мл стандартной жидкой культурой *E. coli* M-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности. Для получения оплошного роста культуру, нанесенную в центр чашки, растирают шпателем равномерно по всей ее площади.

2. Спустя 5-10 минут после посева на подсушенную поверхность питательной среды наносят каплями по 25-50 мкл исследуемый фильтрат. На одной чашке можно поставить несколько (желательно не более четырех) проб. Для этого по дну чашки намечают разделение питательной среды на секторы и в каждый сектор вносят по капле фильтрата. После с того, как жидкость впитается в среду, чашки перевертывают вверх дном и ставят в термостат при 37°C на 24 часа.

3. Учет результатов: доказательством наличия бактериофага служит полное отсутствие роста культуры в месте попадания капли фильтрата (активный бактериофаг) или появление в этом участке мелких стерильных пятен - колоний бактериофага (бактериофаг слабой активности).

### **Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах двухслойным методом Грациа**

1. В эксперименте используется заранее подготовленная плотная питательная среда с содержанием не более 1,5% агара. В пробирку с 2,5 мл 0,7%-ного расплавленного и остуженного до температуры 45°C агара вносят 0,1 мл исследуемого разведения фильтрата (учитывая высокую активность фага в пробе, использовать ее разведение в 100 раз) и 1,0 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* M-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности, соответствующей искомому фагу.

2. Содержимое пробирок быстро перемешивают, чтобы не произошло уплотнения агара при охлаждении, и выливают в ту же чашку вторым слоем. После застудневания агара посев ставят в термостат при 37°C.

3. Учет результатов, как правило, возможен через 24 часа после инкубации в термостате. Присутствие бактериофага определяют по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий.

### **Титрование бактериофага в жидкой среде по методу Аппельмана**

Для выражения титра бактериофага можно пользоваться двумя показателями: количеством активных частиц бактериофага, содержащихся в 1 мл исследуемой жидкости, или (что проще) величиной наибольшего разведения исследуемой жидкости, при которой бактериофаг проявляет свое литическое действие. Полученную при этом величину выражают отрицательным логарифмом 10, где степень указывает разведение фага. Средний титр бактериофага составляет  $10^{-7}$ .

Метод Аппельмана основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в бульон, засеянный одной и той же дозой культуры гомологичных микробов.

1. Десять пробирок, содержащих по 4,5 мл питательного бульона, ставят в штатив в ряд.

2. В 1-ю пробирку стерильной пипеткой вносят 0,5 мл исследуемого фага. Содержимое пробирки перемешивают и 0,5 мл жидкости из 1-ой пробирки переносят во 2-ю, из 2-ой - в 3-ю и т.д. до 8-ой включительно. Из 8-ой пробирки лишние 0,5 мл выливают. 9 и 10 пробирки - контрольные. Переносят жидкость из одной пробирки в другую каждый раз отдельной стерильной пипеткой емкостью 1 мл. Таким образом, в 8 пробирках получают разведения бактериофага от 1:10 до  $10^8$ .

3. Во все 8 пробирок приготовленного ряда разведения вносят по 0,2 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* М-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности, одноименных титруемому фагу.

4. Пробирка 9 - контроль культуры, содержит 5 мл бульона и 0,2 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* М-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности.

5. Пробирка 10 - контроль на стерильность, содержит 5 мл бульона без добавления культуры и фага. Штатив с пробирками помещают в термостат при 37°C.

6. Учет результатов производят через 24 часа после инкубации. **Титром** считают то максимальное разведение бактериофага, при котором наблюдается полный лизис чувствительной к нему культуры. Практически это соответствует той последней пробирке в которой бульон еще остается совершенно прозрачным.

## Лабораторная работа №1.5 и 1.6

### ТЕМА №3: «ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ. БАКТЕРИОЦИНОГЕНИЯ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ»

#### Цели занятия:

- познакомиться с лабораторными методами определения микробного антагонизма и освоить технику определения микробного антагонизма методом «агаровых блоков»;
- познакомиться с основными лабораторными методами определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и освоить технику определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом «дисков» (диффузии в агар);

#### Материалы и оборудование

Лабораторная посуда и вспомогательное оборудование: стерильные чашки Петри, пипетки, пробирки, флаконы, бактериальные петли, плотные питательные агаровые среды в чашках Петри, питательный бульон, физиологический раствор, стандартные диски с антибиотиками, скальпель, пинцет, образцы антибактериальных препаратов, спиртовки, термостат, штативы с пробирками для приготовления разведений, иллюстративный материал.

Бактериальные культуры: *E. coli* М-17, *Bacillus subtilis* 5; *B. licheniformis* 3; *B. cereus*; *Proteus vulgaris*.

#### Ход работы

##### Выявление микробного антагонизма

1. На чашку с плотной питательной средой нанести 0,1 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* М-17, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности, и равномерно распределить шпателем по всей поверхности среды.

2. Дать впитаться посевному материалу (подсохнуть засеянной поверхности среды) в течение 5-10 мин

3. Затем из другой чашки Петри с плотной питательной средой, предварительно засеянной культурой микроорганизма-антагониста (например, *B.*

segeus), вырезать скальпелем вместе с агаром (агаровый блок в виде квадрата размерами 1x1 см) колонию (зону сплошного роста) антагониста и наложить на первую засеянную чашку (колонией кверху). На одну чашку можно положить по ее периметру, отступая 1,5 см от края чашки, три-пять агаровых блоков. Эту чашку (не переворачивая) поставить в термостат при температуре 37°C.

4. Результат учитывать через 24-48 ч: измерить диаметр стерильных зон, образуемых вокруг агарового блока с колонией микроорганизма-антагониста.

5. На занятии теоретически с преподавателем рассмотреть другие варианты выявления микробного антагонизма.

### **Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом дисков (диффузии в агар)**

1. На чашку с подсушенной плотной питательной средой нанести 0,1 мл стандартной жидкой культуры *E. coli* M-17 (или любой другой исследуемой культуры), содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток/мл по оптическому стандарту мутности, и равномерно распределить шпателем по всей поверхности среды.

2. Дать впитаться посевному материалу (подсохнуть засеянной поверхности среды) в течение 5-10 мин

3. На поверхность питательного агара в чашках Петри, засеянного анализируемой культурой, стерильным пинцетом наносят бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками. В каждой чашке может быть испытано действие нескольких антибиотиков (до 5-6 дисков). Диски для тесного контакта со средой плотно накладывают на поверхность агара, следя за тем, чтобы не были положены два сцепленных между собой диска. Диски размещают на равном расстоянии один от другого и на расстоянии 2-1,5 см от края чашки.

4. Чашки ставят в термостат при температуре 37°C в течение суток. Если исследуемый микроорганизм растет медленно, то учет производят через 48 - 72 ч инкубации или позже в зависимости от появления роста газона.

5. Оценка результатов. После соответствующей инкубации поверхность агара, которая вначале была полупрозрачной, мутнеет из-за рассеяния света выросшими бактериями. Полупрозрачные зоны остаются лишь только вокруг дисков с антибиотиками, поскольку антибиотик диффундирует в агар и подавляет рост бактерий.

С помощью линейки или измерителя и миллиметровой бумаги определяют диаметр зон задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самого диска. Отсутствие зон задержки роста микробов вокруг дисков указывает на отсутствие чувствительности микроба к данному антибиотику. При зоне задержки роста микроба диаметром до 10 мм штамм расценивается как малочувствительный. Зона задержки роста микроба более 10 мм указывает на чувствительность штамма к антибактериальному препарату. Чем больше зона задержки роста, тем выше чувствительность микроорганизмов к антибиотику.

Если использовались диски, пропитанные растворами с различными концентрациями одного и того же антибактериального препарата, а диаметр зон задержки роста определялся в строго стандартных условиях, то размер зон будет функцией логарифма концентрации антибиотика. Используя известные концентрации антибиотика, строят стандартную кривую, по которой можно определить концентрацию антибиотика в неизвестных растворах.

6. На занятии теоретически с преподавателем рассмотреть другие методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

## МОДУЛЬ 2 «МИКРООРГАНИЗМЫ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА. ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ»

### Лабораторное занятие № 2.1

#### ТЕМА №4: «ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ (ВЛАЖНОСТЬ, СВЕТ, ТЕМПЕРАТУРА) И ХИМИЧЕСКИХ (АНИСЕПТИКИ, КИСЛОТНОСТЬ) ФАКТОРОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ»

##### Материалы

На каждый стол: 1. По 2 Чашки Петри с подсушенным и увлажненным белым хлебом , всего 4 чашки, простерилизовать при 1 атм. 2. Чашки Петри с МПА (7 шт).

Инструменты и посуда Стерильные пробирки с пробками. Пипетки. Вода. Шпатели. Пинцеты. Петли бактериологические

Диски (d=1 см) из фильтровальной бумаги стерильные (по 3 на стол). Культуры на агаре. *Sarcina sp.*, *Penicillium sp.*, *E. coli*, *Bacillus sp.* На всех вместе: Растворы гипохлорита натрия -5%, фенола -1%, молочной кислоты. Черная бумага , ножницы, клей.

##### Ход работы

##### 1. Влияние влажности на развитие бактерий и грибов.

Белый хлеб (посушенный и влажный стерилизуют в чашках Петри). На поверхность высевают культуры сапрофитных бактерий (*Sarcina sp* ) и плесневого гриба (*Penicillium sp*). На следующем занятии отмечают степень развития (% площади) микроорганизмов на субстрате разной влажности.

##### 2. Влияние света на развитие бактерий

Кишечную палочку высевают газоном на МПА. На дно чашки приклеивают чёрную бумагу. Экспонируют под бактерицидной лампой 20-30 мин. После облучения в термостат при 37° С. Наблюдают отсутствие роста на облучённом участке.

##### 3. Влияние температуры на развитие бактерий.

Культуру *Bacillus sp* высевают газоном на 3 чашки с МПА. Объём суспензии строго одинаков. Одну чашку помещают в термостат при 37 С, другую помещают в камеру холодильника, третью оставляют при комнатной температуре. Делают вывод об оптимальных температурных условиях.

#### **4.Влияние на бактерии растворов антисептиков**

Засеять газонной культурой бактерию (любую) на чашки.

Разместить на поверхности посевов пинцетом стерильные диски из фильтровалки.

Нанести на поверхность дисков пипеткой капли растворов **антисептиков**: гипохлорита натрия -5%, фенола -1%,

#### **5.Влияние на рост бактерий кислотности среды -молочную кислоту (рН)**

## Лабораторное занятие № 2.2

### ТЕМА №5: «ЛЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ *E. COLI.*»

На каждый стол: чашки Петри с МПА - 6 шт, стерильные пипетки на 1 и 5 мл, стерильные пробирки с пробками от 4 до 8 шт., шпатели, физраствор, пустая стерильная чашка Петри с крышкой. На всю группу: жидкая культура *E. coli.* ( $10^9$ ) -15 мл в пробирке

УФЛ повреждают молекулы ДНК. В них возникают тиминовые димеры, подавляющие репликацию. Наибольший эффект УФЛ оказывают при длине волны 260 нм, совпадающем с максимумом поглощения ДНК клеток. Выживаемость клеток зависит экспоненциально от дозы УФЛ.

**Цель работы:** изучение летального действия УФЛ на клетки *E.coli* и определение зависимости выживаемости клеток от дозы облучения.

#### Ход работы

В работе используют суспензию бактерий, которая должна содержать примерно  $2 \cdot 10^9$  клеток в мл. Суспензию разливают по 3 мл в стерильные чашки Петри по числу вариантов опыта (4 варианта), контрольный вариант остаётся в пробирке.

Суспензию облучают УФЛ, используя экспозиции в 8, 16, 24 и 32 с на расстоянии 5 см от ламп. Облучение проводят в открытых чашках Петри, постоянно покачивая для перемешивания суспензии. Время контролируют по секундомеру. После облучения чашки закрывают крышками и помещают в темное место.

Для определения количества жизнеспособных клеток из облученных и контрольной суспензий делают ряд десятичных разведений. Конечное разведение каждого варианта опыта зависит от дозы облучения.

Вариант опыта	Экспозиция, с	Конечное разведение
Контроль	0	$10^{+8}$
1	8	$10^{+7}$
2	16	$10^{-6}$
3	24	$10^0$
4	32	$10^{-4}$

Из трех последних разведений каждого варианта отбирают по 0,1 мл, наносят на поверхность двух чашек Петри с МПА и тщательно растирают стеклянными шпателями. Чашки помещают крышками вниз в термостат при  $37^\circ \text{C}$  на сутки.

По истечении времени инкубации подсчитывают число колоний на чашках, выбирая наиболее удачное разведение суспензии (не более 100 колоний). Рассчитывают количество жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии каждого варианта и выражают выживаемость облученных УФЛ клеток в процентах от контроля. Данные вносят в таблицу.

#### Летальное действие УФЛ на клетки *E. coli* M

Вариант опыта	Разведение	Количество колоний на чашке	Число жизнеспособных клеток в 1 мл	Выживаемость, %
Контроль				100
1				
2				
3				
4				

Вычеркивают кривые выживаемости в зависимости от дозы облучения.

## Лабораторное занятие № 2.3

### ТЕМА №6: «МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ»

#### Материалы и оборудование

##### На всех:

Флакон с антибиотиком, шприц.

Культура *E. coli* на агаровой среде.

На каждый стол: по 8 стерильных пробирок с пробками, пипетки на 1-2 мл, мясо-пептонный бульон во флаконах, физраствор, петля микробиологическая.

#### **Общие сведения.**

В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, которые обладают высокой физиологической активностью по отношению к другим микроорганизмам, задерживая их рост или убивая их. Они называются антибиотиками. В отличие от общебиологических ядов антибиотики проявляют свое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определённым видам или группам микроорганизмов. Мерой чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в лабораторных условиях является минимальная концентрация антибиотика, подавляющая рост (МПК), рассчитанная на 1 мл питательной среды.

Метод определения чувствительности к антибиотику заключается в приготовлении ряда последовательных разведений антибиотика в питательной среде с внесением во все разведения исследуемой культуры. По подавлению роста микроорганизма определённой концентрацией антибиотика в питательной среде судят о степени его чувствительности

**Цель работы:** освоить технику проведения анализа чувствительности микроорганизмов к антибиотику методом серийных разведений.

#### **Ход работы.**

1. Готовят основной (1 мг/мл) и рабочий (200 мкг/мл) растворы антибиотиков.

Для приготовления основного раствора антибиотика, содержащего в 1 мл 1 мг (1000 мкг) антибактериального препарата, вводят во флакон с 0,5 г ан-

антибиотика 5 мл стерильной воды. Отбирают шприцем 0,5 мл из флакона (100 мг/мл) и разводят в 100 раз = основной раствор.

К 1 мл основного раствора доливают 4 мл стерильной воды = рабочий раствор, содержащий 200 мкг/мл антибиотика.

2. Готовят взвесь микроорганизмов.

3. Для приготовления ряда двукратных последовательных разведений антибиотика жидкую питательную среду (МПБ) разливают по 2 мл в 6 пробирок и нумеруют их. В первую пробирку добавляют 2 мл раствора антибиотика с концентрацией 200 мкг/мл, перемешивают, после чего переносят 2 мл в следующую пробирку, продолжая разведение до предпоследней пробирки, из которой удаляют 2 мл.

№	1	2	3	4	5	6
C, мкг/мл	100	50	25	12,5	6,25	0

Последняя, шестая пробирка служит контролем роста культуры. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл приготовленной взвеси микроорганизмов.

Пробирки инкубируют при 37° С в течение суток. Результаты учитывают, определяя наличие или отсутствие роста микроорганизма в среде, содержащей различные разведения антибиотика. Последняя пробирка с задержкой роста (прозрачная среда) соответствует МПК антибиотика в отношении испытуемого штамма и указывает на степень его чувствительности. Если среда помутнела во всех пробирках, то испытуемый микроб устойчив к максимально взятой в опыт концентрации антибиотика. Отсутствие роста во всех пробирках, кроме контрольной, указывает на то, что МПК антибиотика в отношении штамма ниже испытуемых концентраций.

## МОДУЛЬ 3 МИКРООРГАНИЗМЫ КАК БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

### 1. УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРЕВРАЩЕНИИ ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ В БИОСФЕРЕ

(биогеохимические циклы превращения веществ)

Микроорганизмы принимают активное участие в биогеохимических циклах превращения веществ в биосфере. Глобальное значение имеет деятельность микроорганизмов в циклах углерода, азота и серы. Процесс круговорота углерода состоит из синтеза и минерализации органических веществ. Ежегодно накапливаемое органическое вещество в процессе фотосинтезирующей деятельности, главным образом, растений и водорослей, перерабатывается на разных уровнях жизни консументами и деструкторами. К первым принадлежат, в основном, животные, ко вторым – грибы и бактерии. Последовательность этих событий выражается в трофических цепях или цепях питания. Конечное, деструктивное, звено этой цепи – минерализация органических веществ с возвратом  $\text{CO}_2$  в атмосферу – осуществляется гетеротрофными микроорганизмами.

Первыми деструкторами природных биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, гемицеллюлозы, пектина, крахмала, целлюлозы, лигнина и др.) могут выступать лишь те микроорганизмы, которые синтезируют гидролитические ферменты. В аэробной зоне к таким микроорганизмам относятся грибы, некоторые, главным образом, грамположительные бактерии, в том числе и актиномицеты. В анаэробной зоне – это только бактерии, в основном из группы клостридий. В аэробной зоне происходит практически полное превращение полимеров с освобождением  $\text{CO}_2$ . В анаэробных условиях в процессе первичного разложения органических веществ в качестве продуктов распада образуются жирные кислоты, спирты и молекулярный водород, которые частично используются вторичными анаэробами, например, сульфатредуцирующими и денитрифицирующими бактериями в качестве источника углерода при восстановлении неорганических акцепторов электрона или метанобразующими бактериями в процессе карбонатного дыхания.

**Азот** - один из главных биогенных элементов - входит в состав основных полимеров любой живой клетки (структурных белков, белков – ферментов, нуклеиновых и аденозинфосфорных кислот). Большие запасы азота на планете представлены его восстановленными и окисленными газообразными формами ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ), которые входят в состав атмосферы Земли. Молекулярный азот составляет 78,09% (по объему) атмосферных газов. Главными агентами круговорота азота в природе выступают микроорганиз-

мы (рисунок 1). Азот в этом цикле участвует в газообразной форме, в виде минеральных и органических соединений. При **фиксации** азота микроорганизмами происходит его восстановление; при разложении органических азотсодержащих соединений (**аммонификация**) азот освобождается в форме аммиака, который далее окисляется последовательно до нитритов и нитратов (нитрификация). Окисленный азот вновь восстанавливается до  $N_2$  в процессе **денитрификации**. Аммонийные и нитратные формы азота ассимилируются растениями в виде органических веществ.

**Сера**, биогенный элемент, содержится в белках в форме аминокислот, входит в состав молекул витаминов, коферментов. В природе сера претерпевает разнообразные химические и биологические превращения, переходя из неорганических соединений в органические и обратно. При разложении остатков животных, растений, микроорганизмов освобождаются серосодержащие аминокислоты, тиоспирты, тиофенолы, тиоэфиры, гетероциклические соединения, в которых сера находится в восстановленном состоянии. В цикле превращения серы участвуют разнообразные группы микроорганизмов (бактерии и архебактерии, аэробные и анаэробные, хемо- и фототрофы - рисунок 2).

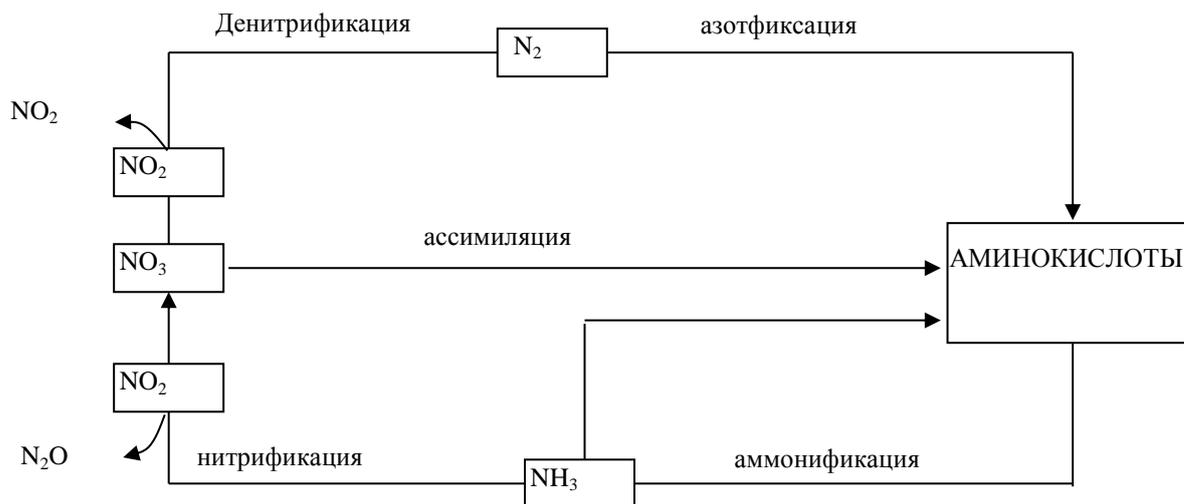


Рисунок 1 – Круговорот азота в природе

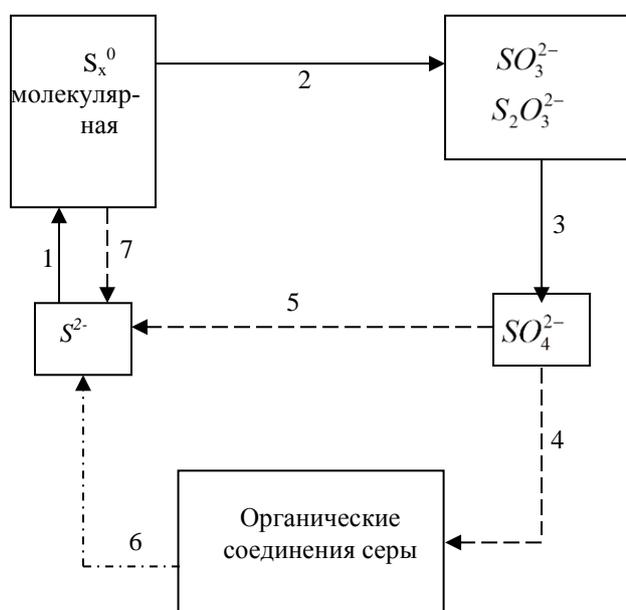


Рисунок 2 – Цикл превращения серы:

- восстановительные процессы
- ..... без перемены валентности серы
- окислительные процессы

1 – бесцветные серобактерии, тионовые (в аэробных условиях) и фотосинтезирующие серные бактерии (в анаэробных условиях);

2, 3 - тионовые бактерии, архебактерии;

4 – все микроорганизмы и растения (ассимиляция);

5 – сульфатредуцирующие бактерии;

6 – термоацидофильные анаэробные бактерии;

7 – облигатно анаэробные термофильные клостридии

В аэробных условиях окислительные процессы серы и ее восстановленных неорганических и органических соединений осуществляют хемоавтотрофные прокариоты (серные, тионовые бактерии), а также некоторые типичные гетеротрофные бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др.

В анаэробных процессах участвуют фототрофные серные пурпурные и зеленые бактерии, осуществляющие бескислородный фотосинтез.

При ассимиляции сульфатов, как источника серы, происходит восстановление серы в процессах конструктивного метаболизма – ассимиляционная сульфатредукция. Биологическое закрепление растворимых сульфатов в микробных клетках называется также иммобилизацией серы.

В анаэробных условиях сульфаты восстанавливаются до сероводорода узкоспециализированной группой облигатных анаэробов сульфатредуцирующих бактерий в процессе анаэробного дыхания.

Восстановление  $SO_3^{2-}$  и  $S_2O_3^{2-}$  до  $S^0$  осуществляют облигатно анаэробные термофильные бактерии р. *Clostridium*.

В восстановлении молекулярной серы до  $H_2S$  участвуют многие термоацидофильные строго анаэробные архебактерии.

При разложении белковых веществ (обычно этот процесс называется гниением) выделяется сероводород и ряд других летучих дурнопахнущих продуктов. Гнилостные микроорганизмы – это аэробные и анаэробные микроорганизмы родов *Bacillus* и *Clostridium*. Процессы восстановительных звеньев цикла серы тесно сопряжены с окислительными, и часто сульфатредуцирующие бактерии развиваются в общих местообитаниях с серными, которые окисляют сероводород, поступающий из анаэробной зоны.

## **2. НАКОПИТЕЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ (методы получения и исследования)**

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются крайне редко. В то же время основная часть современных представлений об их свойствах, а также о взаимоотношении с представителями других групп организмов получена при изучении чистых культур. Поэтому часто возникает необходимость выделить чистые культуры различных видов микроорганизмов из объектов внешней среды, когда они тесно сосуществуют в естественных условиях с микробами других видов, родов, семейств, групп и отделов.

Микробиологи для этих целей используют в качестве одного из основных - метод накопительных культур. **Накопительными** называются культуры, в которых преобладает одна группа или даже один вид микроорганизмов. **Накопление** представляет собой основной этап процесса, который в конечном итоге позволяет получить чистые культуры. Оно также дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию, благодаря которым может происходить отбор микроорганизмов, способных взаимодействовать со специфическими субстратами или способных хорошо расти в необычных условиях. Для получения накопительных культур создают элективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие лишь данной группы или данного вида микроорганизмов и неблагоприятные для развития, сопутствующих форм микробов смешанной популяции.

Чистую культуру микроорганизма легко выделить, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой пропорции или даже преобладает количественно над другими видами, составляющими биоценоз смешанной популяции. Разработанные и используемые в микробиологии методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества особей данного организма за счет создания лучших (элективных, избирательных) условий для их роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения одного из микроорганизмов от других членов популяции. Элективные условия предусматривают ряд факторов, влияющих на жизнедеятельность микроорганизма; например: его потребность в определенном питательном субстрате, отношение к кислороду, кислотности среды, температуре выращивания, способности к образованию спор и т.д. О развитии накопительной культуры судят визуально по характерным признакам изменения питательной среды, образованию пленки, выделению пигмента, появлению мути, возникновению пузырьков газа, а также по микроскопии микроорганизма на прижизненных и постоянных микробиологических препаратах.

На основе накопительных культур далее выделяют чистые культуры микроорганизмов.

Получение накопительных культур различных таксономических групп проводят при использовании физических, химических и биологических методов.

К **физическим методам**, которые могут быть использованы для получения накопительных культур, следует отнести: регуляцию роста температурой, тепловое одномоментное воздействие, ультразвуковую обработку и ульт-

трафиолетовое облучение, приводящих избирательно к гибели или подавлению роста других микроорганизмов, присутствующих в популяции. Можно также использовать преимущества изучаемого микроорганизма в некоторых физических свойствах, таких, как его размеры и подвижность.

**В химических методах** используют токсичные для микроорганизмов вещества, антибиотики, химиопрепараты, которые подавляют рост или убивают большинство микробов находящихся в исследуемой популяции, не оказывая существенного влияния на выделяемый микроорганизм.

**Биологические методы** включают использование специфических чувствительных хозяев (животных), которые служат биофильтром для всей исследуемой популяции микроорганизмов. Данный способ используют в большей степени при работе с патогенными микроорганизмами, которые за счет своих свойств (инвазивность, токсигенность и др.) получают преимущества при развитии в организме чувствительных животных.

Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления используют сочетания физических, химических и биологических методов.

Как правило, накопительные культуры получают в закрытых системах, т.е. микроорганизмы выращивают в обычных периодических (стационарных) условиях в колбах или пробирках, где концентрация питательных веществ и продуктов метаболизма постоянно меняется в процессе их роста. Для получения накопительных культур также используются открытые системы. Например, с помощью хемостата можно обеспечить постоянство окружающей среды для бактерий, непрерывно подавая питательные вещества в концентрации, лимитирующей рост, и удаляя продукты метаболизма. Изменяя скорость разбавления среды в хемостате, можно контролировать концентрацию питательных веществ, лимитирующих рост. В свою очередь это может избирательно влиять на скорость роста различных микроорганизмов в смешанной культуре, в результате чего один из микроорганизмов смешанной популяции начинает количественно преобладать.

Из накопительных культур бактерии обычно выделяют путем их отделения на плотных питательных средах, используя специальные методы посева (например, по способу Дригальского). Для микроорганизмов, не растущих на твердых средах, можно использовать метод предельного разведения, последовательно перенося исследуемую культуру из пробирки в пробирку с питательной средой. Обычно используют пятикратные или десятикратные разведения.

## Лабораторная работа № 3.1

### ТЕМА №7: «ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ»

#### Цели работы

1. Освоить методику получения накопительных культур
2. Изучить характер роста культур сульфатредуцирующих бактерий
3. Описать морфологию сульфатредуцирующих бактерий

#### Вопросы для самоконтроля

1. Определение понятия "накопительная культура", методы её получения
2. Последовательность реакций в цикле серы
3. Состав среды Постгейта
4. Особенности метаболизма сульфатредуцирующих облигатных анаэробов
5. Характер роста культур сульфатредуцирующих бактерий
6. Состав конечных продуктов процесса сульфатредукции
7. Основные части микроскопа, их назначение и устройство
8. Способы фиксации микропрепарата
9. Порядок установки света на микроскопе

#### Введение

Восстановление сульфатов микроорганизмами может иметь разное значение. Большое число видов способны использовать сульфаты как источник серы. Это требует восстановления  $SO_4^{2-}$  до  $S^{2-}$ , необходимой для биосинтеза серосодержащих органических веществ клеток. Такой процесс носит название ассимиляционной сульфатредукции.

Известен также ряд бактерий, которые используют сульфат в качестве конечного акцептора электронов при анаэробном дыхании. Этот процесс, ведущий к накоплению в среде сероводорода, называют диссимиляционной сульфатредукцией или сульфатным дыханием, а бактерии, его осуществляющие, - сульфатредуцирующими. К числу сульфатредуцирующих бактерий относится значительное число анаэробных бактерий с разной морфологией. Среди них есть гетеротрофные и автотрофные виды. Некоторые из них способны не только к сульфатному дыханию, но и к брожению.

Для получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий применяют **среду Постгейта** следующего состава:

Раствор 1 (г):  $K_2HPO_4$  -1;  $NH_4Cl$  -1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  - 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 2; лактат Na (70% раствор) - 3,5; дрожжевой экстракт - 1; pH 7,4; дистиллированная вода - 980 мл.

Раствор 2 (г):  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,5; дистиллированная вода - 10 мл.

Раствор 3 (г): аскорбиновая кислота - 0,1; Na-тиогликолят - 0,1; pH 7,4, дистиллированная вода - 10 мл.

Растворы стерилизуют отдельно, затем их сливают и разливают по стерильным пробиркам до самого верха.

### Материалы и оборудование

$K_2HPO_4$ ;  $NH_4Cl$ ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; лактат Na (70% раствор); дрожжевой экстракт; аскорбиновая кислота; Na-тиогликолят; дистиллированная вода.

Образец почвы; парафин; резиновые или притертые пробки; пробирки; термостат.

Микроскопы, предметные и покровные стёкла.

### Задание

1. Получить накопительную культуру сульфатредуцирующих бактерий. Описать характер роста.
2. Приготовить фиксированный препарат.
3. Микроскопировать с объективом 90х. Зарисовать.

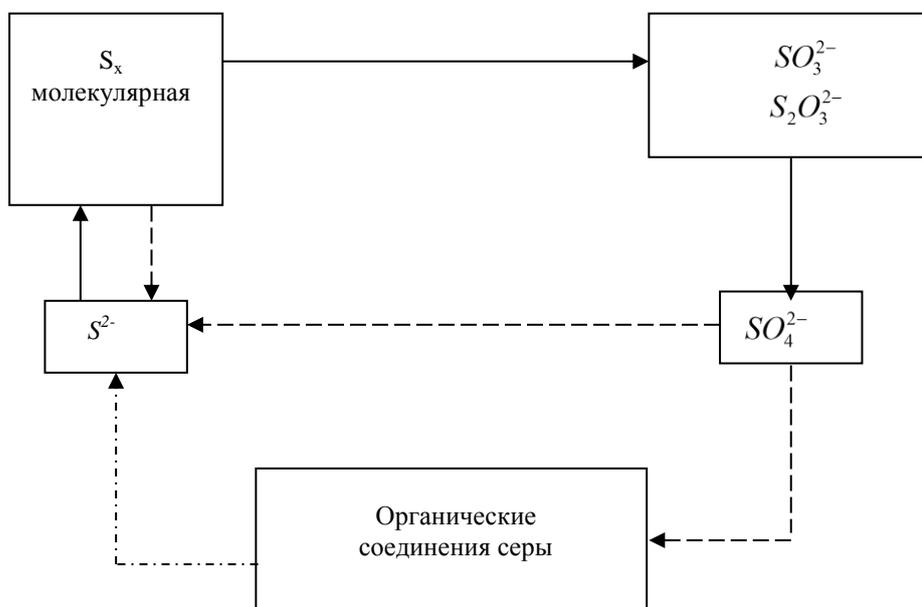


Рисунок – Цикл превращения серы:

- восстановительные процессы
- ..... без перемены валентности серы
- окислительные процессы

- 1 – бесцветные серобактерии, тионовые (в аэробных условиях) и фотосинтезирующие серные бактерии (в анаэробных условиях);
- 2, 3 - тионовые бактерии, архебактерии;
- 4 – все микроорганизмы и растения (ассимиляция);
- 5 – сульфатредуцирующие бактерии;
- 6 – термоацидофильные анаэробные бактерии;
- 7 – облигатно анаэробные термофильные клостридии

### **Ход работы**

Среду Постгейта в стерильных пробирках инокулируют почвой (лучше болотной). Пробирки закрывают резиновыми или притертыми пробками и заливают парафином. Инкубируют в течение 20 - 25 дней при 30°C.

Развитие сульфатредуцирующих бактерий регистрируют по почернению осадка в пробирках вследствие образования сернистого железа.

### **Материалы, представляемые в отчёте**

1. Название и цели работы
2. Описание характера процессов, протекающих в процессе сульфатредукции
3. Зарисовка и описание морфологии сульфатредуцирующих бактерий

### **Литература**

1. Г. Шлегель. Общая микробиология. – М., Мир, 1987. С. 352 - 355
2. М.В. Гусев, Л.А. Минеева. Микробиология, 4-изд. - М.: "Академия", 2003. С. 370 – 375
3. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С. Лабораторный практикум по общей микробиологии. - М., 1998.
4. Лекции по разделу "Микроорганизмы как биогеохимические объекты".

## Лабораторная работа № 3.2

### ТЕМА №8: «ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ, РАЗРУШАЮЩИХ ЦЕЛЛЮЛОЗУ (КЛЕТЧАТКУ)»

#### Цели работы

1. Освоить методику получения накопительных культур
2. Изучить характер роста культур целлюлозоразрушающих бактерий
3. Изучить процесс разложения целлюлозы до глюкозы и её дальнейшее превращение в аэробных и анаэробных условиях
4. Описать морфологию целлюлозоразрушающих бактерий

#### Вопросы для самоконтроля

1. Определение понятия "накопительная культура"
2. Состав питательных сред Гетчинсона и Имшенецкого
3. Пути и продукты разложения целлюлозы в аэробных и анаэробных условиях
4. Особенности метаболизма бактерий рода *Clostridium*
5. Классификация питательных сред по консистенции
6. Техника посева на жидкие и полужидкие среды
7. Методы определения биологической концентрации
8. Основные части микроскопа, их назначение и устройство
9. Техника приготовления препарата «висячая капля»
10. Техника приготовления препарата «раздавленная капля»
11. Приготовление мазка и его фиксация
12. Окраска по Граму

#### Введение

Наиболее распространенным углеводным соединением в природе является целлюлоза. Целлюлоза составляет от 15 до 60% массы растений, в хлопке и льне содержание целлюлозы достигает 80-95%.

Разложение целлюлозы микроорганизмами является самым большим по масштабам естественным деструкционным процессом, звеном круговорота углерода, обеспечивающим возврат фиксированного в процесс фотосинтеза углерода в атмосферу в виде CO<sub>2</sub>.

Глобальная роль микроорганизмов в этом процессе определяется тем, что ни животные, ни растения, как правило, не способны разлагать целлюлозу. Трансформация целлюлозосодержащих соединений в природе происходит в разных условиях аэрации, температуры, pH среды.

В природе разложение целлюлозы – это сложный, комплексный процесс, происходящий при участии сообщества микроорганизмов, в состав которого входят микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, и микроорганизмы - спутники, использующие продукты распада.

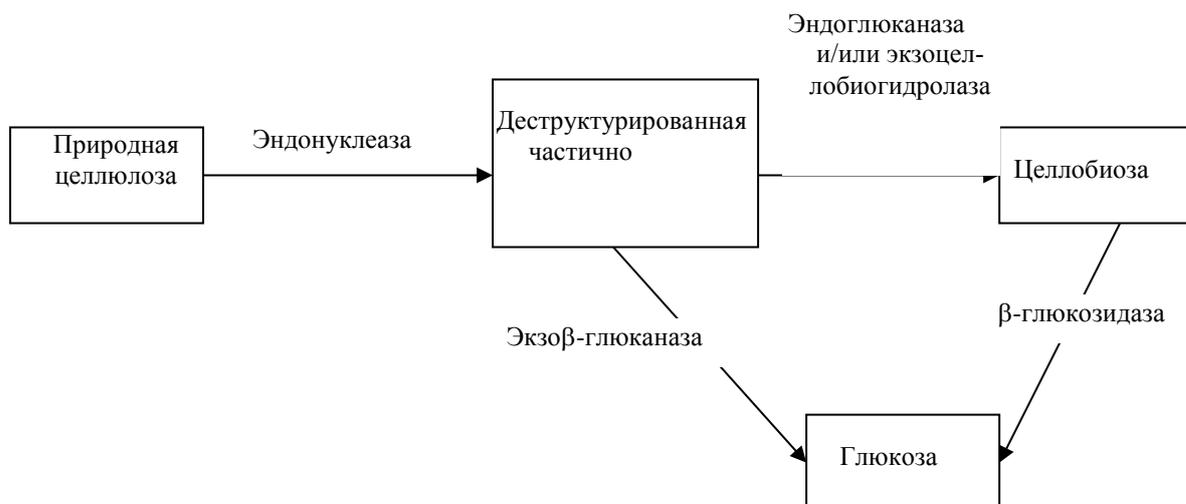
В анаэробных условиях разложение целлюлозы осуществляется анаэробными бактериями рода *Clostridium*. При этом образуются различные органические кислоты (уксусная, янтарная, молочная, масляная, муравьиная), этиловый спирт, углекислый газ и водород.

В отличие от процесса анаэробного разложения целлюлозы, который осуществляется только бактериями, в аэробных условиях клетчатку разлагают многие микроорганизмы разных систематических групп: бактерии, миксобактерии, актиномицеты, грибы.

В кислых лесных почвах главная роль в превращении целлюлозы принадлежит грибам (р. *Aspergillus*, *Penicillium* и др., базидиальные грибы).

В почвах под травянистой растительностью, в степных и луговых ландшафтах в разложении целлюлозы, помимо грибов, участвуют миксобактерии, актиномицеты, вибрионы р. *Cellvibrio*.

Разложение целлюлозы до глюкозы микробными ферментами протекает в несколько стадий и требует участия сложного ферментного комплекса, включающего не менее четырех ферментов (см. схему).



В анаэробных условиях глюкоза сбраживается в основном по типу маслянокислого брожения. В аэробных условиях глюкоза окисляется микроорганизмами до оксикислот, а затем до конечных продуктов – углекислого газа и воды.

Для получения накопительной культуры целлюлозоразрушающих аэробных бактерий используют среду Гетчинсона (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1;  $\text{FeCl}_3$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaNO}_3$  – 2,5; агар-агар – 2%.

Для получения накопительной культуры анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий используют среду Имшенецкого: мясо-пептонный бульон – 500 мл;  $\text{CaCO}_3$  – 2 г, фильтровальная бумага – 15 г; водопроводная вода – 0,5 л.

### **Материалы и оборудование**

Стерильные пробирки, стерильные фарфоровые чашки, резиновые перчатки.

Чашки Петри и пробирки с питательной средой, стеклянные палочки, эксикатор, фильтровальная бумага.

Микроскопы (Биолам Р-11, Биолам Р-15), предметные и покровные стекла, спиртовки, петли бактериологические.

### **Задание**

1. Получить накопительную культуру целлюлозоразрушающих аэробных микроорганизмов. Подсчитать относительное количество целлюлозоразрушающих бактерий в почве. Описать морфологию их колоний. Описать морфологическое разнообразие клеток выросших микроорганизмов. Приготовить препараты «раздавленная капля». Микроскопировать с объективом 40х.

2. Получить накопительную культуру целлюлозоразрушающих анаэробных микроорганизмов. Описать характер протекающих процессов. Приготовить фиксированный препарат, окрашенный фуксином, микроскопировать с объективом 20х. Описать и зарисовать морфологию анаэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

### **Ход работы**

Получение накопительной культуры аэробных целлюлозоразрушающих бактерий.

Среду Гетчинсона разливают в чашки Петри и на поверхность накладывают стерильную фильтровальную бумагу, вырезанную по размеру чашки Петри.

Образцы почвы помещают в стерильные пробирки, непосредственно в месте их сбора. Для разрушения почвенных агрегатов используют метод растирания почвы, увлажненной до пастообразного состояния в течение 5 минут в стерильной фарфоровой чашке резиновыми пестиками или пальцем в резиновой перчатке.

Стеклянной палочкой с оттянутым концом на поверхность фильтра раскладывают параллельными рядами комочки почвы на расстоянии 1 см (по трафарету). Засеянные чашки Петри помещают в эксикатор над водой и ставят в термостат при 25-30<sup>0</sup>С.

Через 10-14 суток вокруг комочков почвы развиваются колонии целлюлозоразрушающих микроорганизмов в виде желтых, зеленых, оранжевых и коричневых пятен. В местах образования колоний фильтровальная бумага разлагается, ослизняется, становится прозрачной. По морфологии можно дифференцировать колонии плесневых грибов, актиномицетов и бактерий. Принимая общее число высеванных комочков за 100%, можно подсчитать в процентах число комочков почвы, давших колонии целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Из зон разрушения клетчатки готовят препарат «раздавленная капля» и описывают выделенные различные целлюлозоразрушающие микроорганизмы.

#### Получение накопительной культуры анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий

Среду Имшенецкого разливают высоким слоем в высокие пробирки. На дно опускают нарезанную полосками фильтровальную бумагу. Пробирки закрывают ватными пробками, затем содержимое пробирок стерилизуют и засевают комочком почвы. Инкубируют в течение 10-14 суток в термостате при 30-35<sup>0</sup>С для обнаружения мезофильных бактерий и при 60<sup>0</sup>С – для поиска термофильных бактерий.

Через 3...4 суток при 60<sup>0</sup>С в пробирках начинается процесс разрушения клетчатки, жидкость пенится, выделяется газ. Полоски фильтровальной бумаги желтеют, ослизняются, постепенно превращаясь в аморфную массу, и оседают на дно. При 30...35<sup>0</sup>С разрушение клетчатки происходит медленнее. Разрушенные массы клетчатки подвергаются микроскопическому анализу. Готовят фиксированный препарат.

## **Материалы, представляемые в отчёте**

1. Название и цели работы
2. Описание характера процессов, протекающих при аэробном и анаэробном разложении целлюлозы
3. Подсчет относительного количества аэробных целлюлозоразрушающих бактерий в почве
4. Описание морфологии колоний аэробных целлюлозоразрушающих бактерий
5. Зарисовка микропрепарата «раздавленная капля» аэробных целлюлозоразрушающих бактерий
6. Описание и зарисовка морфологии анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий

## **Литература**

1. Г. Шлегель. Общая микробиология. – М., Мир, 1987. С. 403 – 408.
2. М.В. Гусев, Л.А. Минеева. Микробиология, 4-изд. - М.: "Академия", 2003. С. 403 – 404.
3. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С. Лабораторный практикум по общей микробиологии. - М., 1998.
4. Лекции по разделу "Микроорганизмы как биогеохимические объекты".

## Лабораторная работа № 3.3

### ТЕМА №9: «ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ»

#### Цели работы

1. Освоить методику получения накопительных культур
2. Изучить характер роста культур денитрифицирующих бактерий
3. Описать морфологию денитрифицирующих бактерий

#### Вопросы для самоконтроля

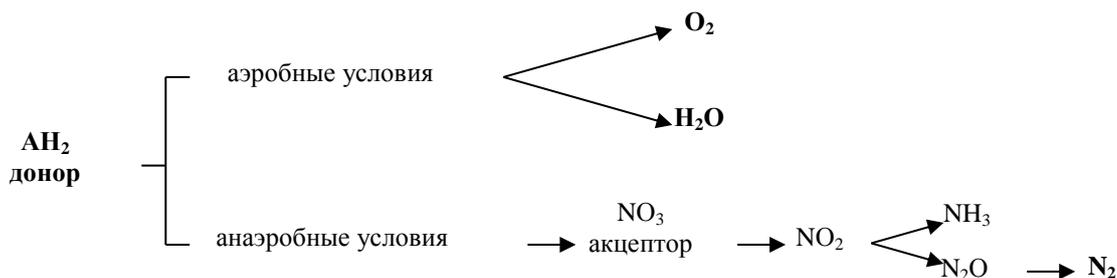
1. Методы получения накопительных культур
2. Состав синтетической среды Гильтая
3. Тип энергетического обмена хемолитотрофных бактерий
4. Особенности метаболизма *Thiobacillus denitrificans*
5. Состав конечных продуктов денитрификации
6. Характер роста культур денитрифицирующих бактерий
7. Основные части микроскопа, их назначение и устройство
8. Способы фиксации микропрепарата
9. Порядок установки света на микроскопе

#### Введение

Термином "денитрификация" обычно обозначают совокупность процессов, которые ведут к образованию газообразных форм азота (в результате восстановления нитратов и нитритов) и к потере запасов азота в почве.

В отличие от ассимиляционной нитратредукции - восстановления нитратов в анаболических процессах, которые приводят к синтезу азотсодержащих клеточных компонентов, - процессы денитрификации называются диссимиляционной нитратредукцией. Процессы денитрификации протекают в анаэробных условиях и представляют собой анаэробное нитратное дыхание. Конечные продукты денитрификации выделяются из клетки в газообразной форме в виде  $\text{N}_0$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  или  $\text{N}_2$  в зависимости от вида микроорганизма и условий среды. Число родов бактерий, представители которых способны к нитратному дыханию, велико. Они распространены во влажных слабоаэрируемых почвах с высоким содержанием органических веществ. Это факультативно-анаэробные хемоорганогетеротрофы родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

Процесс денитрификации могут осуществлять представители хемолитотрофных бактерий, например, *Thiobacillus denitrificans*, нитраты для которых выступают в качестве окислителей неорганических веществ.



Для получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий используют синтетическую среду Гильтая следующего состава (г):

Растворы I и II сливают и доводят объем до 1000 мл дистиллированной водой (pH 7,0). Среду разливают высоким слоем в пробирки и стерилизуют в автоклаве при 0,5 ати 20 мин.

### Материалы и оборудование

Синтетическая среда Гильтая,  $\text{KNO}_3$ , аспарагин,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , натрий лимоннокислый,  $\text{FeCl}_3$ , масло вазелиновое, вода дистиллированная, образец почвы.

Дифениламин, реактив цинк-йод-крахмал, реактив Несслера,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20%-ная),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (конц.).

Колбы мерные объемом 50, 250 и 1000 мл, автоклав, pH-метр (индикаторная бумага), пробки ватные, фарфоровая чашка.

Микроскопы, предметные и покровные стёкла

### Задание

1. Получить накопительную культуру денитрифицирующих бактерий. Описать характер ее роста (помутнение, вспенивание, пигментация).

2. Приготовить фиксированный препарат со дна пробирки. Микроскопировать при объективе 100х. Описать морфологию денитрифицирующих бактерий. Зарисовать.

3. Провести качественные реакции на содержание в среде азотной, азотистой кислоты и аммиака. Записать результаты.

### Ход работы

Содержимое пробирок заражают комочком почвы, плотно закрывают пробками и термостатируют при 30-35°C. Для создания анаэробных условий поверхность жидкости в пробирках покрывают тонким слоем вазелинового масла.

Через 7-10 суток при анализе среды отмечают ее помутнение, образование пены в результате развития микроорганизмов и выделения газов CO<sub>2</sub> и N<sub>2</sub>. Нередко при развитии бактерий *Ps. aeruginosa*, образующих зеленовато-синий пигмент, наблюдается позеленение жидкости.

Ход процесса денитрификации контролируется также по исчезновению нитратов и нитритов из среды по качественной реакции с дифениламином и реактивом цинк-йод-крахмал и по появлению аммиака в среде с реактивом Несслера. Для этого в фарфоровую чашку к 3 каплям реактива цинк-йод-крахмал добавляют 1 каплю 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 1 каплю исследуемой жидкости. В присутствии азотистой кислоты жидкость окрашивается в темно-синий цвет.

Оценка присутствия азотной кислоты в среде проводится по реакции с дифениламином. В фарфоровую чашечку к 3-4 каплям концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> добавляют кристаллик дифениламина и, после его растворения, 1 каплю исследуемой жидкости. При наличии азотной кислоты жидкость окрашивается в темно-синий цвет.

Для определения накопления аммиака в среде на фарфоровую пластинку к нескольким каплям среды добавляют каплю реактива Несслера. В присутствии следов аммиака жидкость окрашивается в желтый цвет, при большей концентрации аммиака образуется коричневый осадок.

### Материалы, представляемые в отчёте

1. Название и цели работы
2. Описание характера процессов, протекающих при денитрификации
3. Зарисовка и описание морфологии денитрифицирующих бактерий

## Литература

1. Г. Шлегель. Общая микробиология. – М., Мир, 1987. С. 304 – 309.
2. М.В. Гусев, Л.А. Минеева. Микробиология, 4-изд. М.: "Академия", 2003. С. 404 – 407.
3. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М., 1998.
4. Лекции по разделу "Микроорганизмы как биогеохимические объекты".

## Лабораторная работа № 3.4

### ТЕМА №10: «ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ АММОНИФИКАТОРОВ»

#### Цели работы

1. Освоить методику получения накопительных культур
2. Изучить характер роста культур
3. Описать морфологию анаэробных бактерий аммонификаторов

#### Вопросы для самоконтроля

1. Определение понятия "накопительная культура", методы её получения
2. Последовательность реакций в цикле азота
3. Особенности метаболизма микроорганизмов аммонификаторов
4. Характер роста культур аммонифицирующих бактерий
5. Состав конечных продуктов процесса аммонификации
6. Основные части микроскопа, их назначение и устройство
7. Способы фиксации микропрепарата
8. Порядок установки света на микроскопе

#### Введение

Процесс аммонификации, т. е. разложения (минерализации) органических азотсодержащих веществ (белков, пептидов, аминокислот, нуклеиновых кислот, мочевины, хитина, гумусовых веществ) с выделением аммиака осуществляется широкой группой микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, грибов) в широком диапазоне температурных условий и аэрации (см. схему).

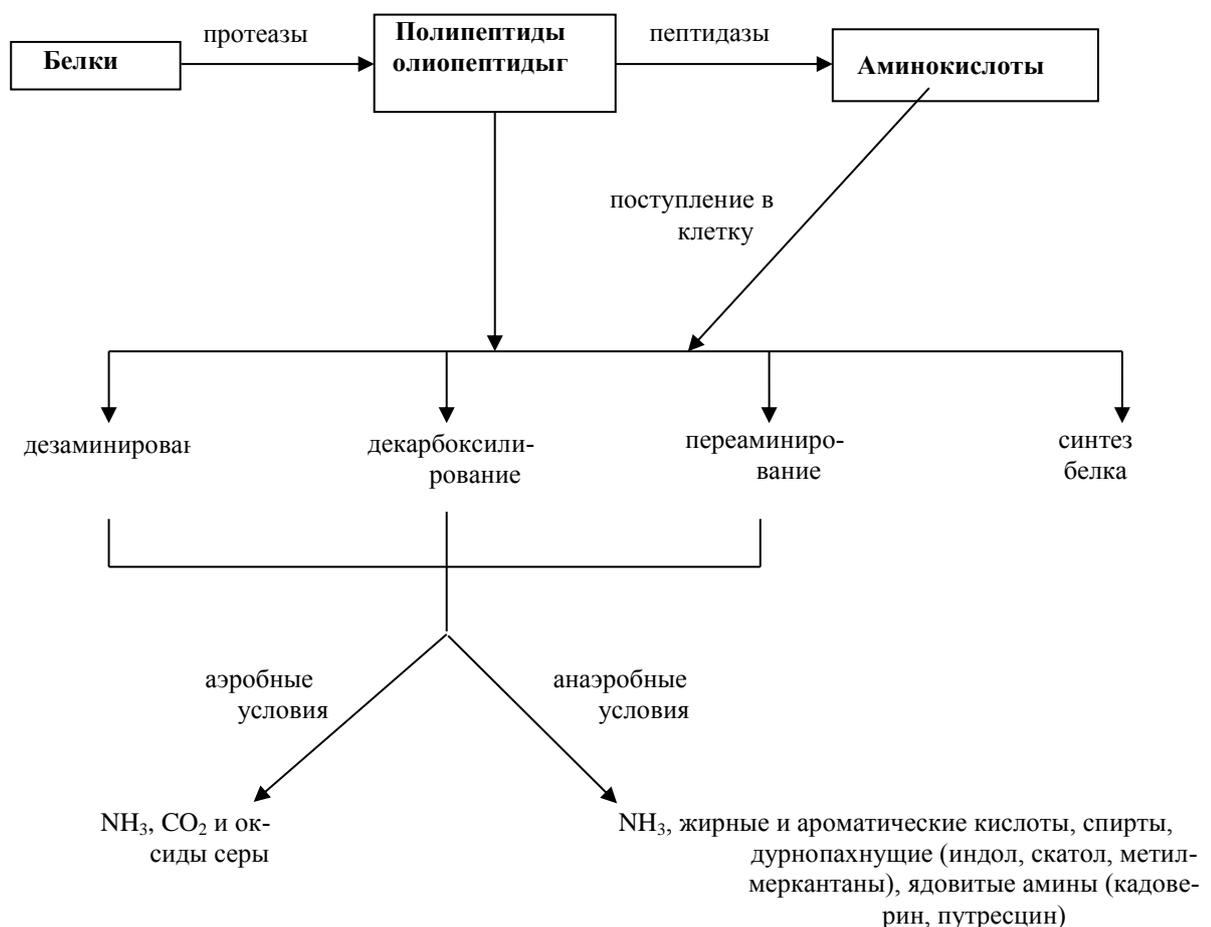
Аммонификация белков (гниение) является наиболее динамичным звеном в цикле азота. Для выявления аммонификаторов - анаэробов получают их накопительную культуру на мясном бульоне с добавлением 2% пептона. Среду наливают высоким слоем в большие пробирки, плотно закрывают ватными пробками и стерилизуют.

## Материалы и оборудование

- 1) мясной бульон с добавлением 2% пептона;
- 2) полоска красной лакмусовой бумаги;
- 3) полоска фильтровальной бумаги;
- 4) 10% -ный р-р уксуснокислого свинца;
- 5) целлофановый колпачок;
- 6) ватные пробки
- 7) образец почвы;
- 8) пробирки;
- 9) автоклав.
- 10) микроскопы, предметные и покровные стёкла

## Задание

1. Получить накопительную культуру анаэробных микроорганизмов, аммонифицирующих белок.
2. Описать качественную реакцию на присутствие продуктов аммонификации: аммиака и сероводорода.
3. Приготовить фиксированный препарат из нижних слоев жидкости. Микроскопировать с объективом 100х. Описать морфологию выделенных в накопительной культуре микроорганизмов – аммонификаторов



## **Ход работы**

Среду заражают комочком почвы. Для обнаружения выделяющегося аммиака под пробку пробирки подвешивают полоску красной лакмусовой бумаги, а для обнаружения сероводорода - полоску фильтровальной бумаги, смоченную 10% раствором уксуснокислого свинца. Для герметичности пробирку плотно закрывают целлофановым колпачком.

Пробирки инкубируют при 25-28°C. Через 3-5 суток определяют присутствие в среде продуктов аммонификации белков. Выделение аммиака - по посинению лакмусовой бумаги, выделение сероводорода - по почернению фильтровальной бумаги, смоченной уксуснокислым свинцом.

## **Материалы, представляемые в отчёте**

1. Название и цели работы.
2. Описание характера процессов, протекающих в процессе аммонификации.
3. Зарисовка и описание морфологии аммонифицирующих бактерий.

## **Литература**

1. Г. Шлегель. Общая микробиология. – М., Мир, 1987. С. 429 – 433.
2. М.В. Гусев, Л.А. Минеева. Микробиология, 4-изд. - М.: "Академия", 2003. С. 401 – 403.
3. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М., 1998.
4. Лекции по разделу "Микроорганизмы как биогеохимические объекты".

## Лабораторная работа № 3.5

### ТЕМА №11: «ОБНАРУЖЕНИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ»

#### Цели работы

1. Овладеть методикой получения накопительных культур свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов из почвенного образца.
2. Изучить морфологические свойства *Cl. pasteurianum* и *Azotobacter chroococcum*.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Основные части микроскопа, их назначение и устройство.
2. Порядок установки света на микроскопе.
3. Способы фиксации микропрепарата.
4. Методика приготовления препарата «висячая капля».
5. Общая характеристика роста микроорганизмов в жидких питательных средах.
6. Определение понятия "накопительная культура", методы её получения.
7. Основное назначение элективных сред.
8. Элективные условия для *Clostridium pasteurianum*.
9. Тип энергетического обмена *Clostridium pasteurianum*.
10. Причины относительно длительного периода инкубации азотфиксирующих бактерий.

#### Введение

Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы распространены повсеместно и встречаются среди бактерий самых разных таксономических групп, относящихся как к хемотрофам, так и к фототрофам, к аэробам и анаэробам. Наиболее хорошо изучен среди свободноживущих аэробных азотфиксирующих бактерий азотобактер.

*Azotobacter chroococcum* – это соединенные в пары одиночные кокковидные клетки размером 3...7 мкм. В старой культуре клетки обычно окружены слизистой капсулой, а колонии темнеют до темно-серого и темно-коричневого цвета. Активность азотфиксации - до 20 мг азота на 1 г потреб-

ленного органического вещества. Элективными условиями для азотобактера, способного фиксировать азот атмосферы, являются аэрация, отсутствие в питательной среде азота и присутствие фосфора и кальция, к которым требуются азотобактер.

Наиболее изученными анаэробными свободноживущими азотфиксирующими организмами являются маслянокислые бактерии *Clostridium pasteurianum*, активность азотфиксации которых достигает 12 мг азота на 1 г потребленного органического вещества.

Для обнаружения азотфиксирующих организмов в природных условиях используют метод получения накопительных культур на природных средах, в которых отсутствует источник азота. В частности используется среда Эшби, г/л:

- маннит (или глюкоза, или сахароза) - 20,0
- $K_2HPO_4$  - 0,2
- $MgSO_4$  - 0,2
- $NaCl$  - 0,2
- $K_2SO_4$  - 0,1
- $CaCO_3$  - 5,0
- pH = 6,0-6,5

### Материалы и оборудование

Микроскопы, предметные и покровные стекла.

Колбы на 100 (150) мл, пробки ватные, петля микробиологическая, спиртовка, пипетки на 5 мл, пробирки, термостат, держатель для пробирок.

Образцы почвы, р-р Люголя, жидкая питательная среда Эшби, 2% р-р  $FeCl_3$ , спирт, тушь.

### Задание

1. Получить накопительную культуру свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов. Описать характер роста.

2. Приготовить фиксированный препарат из образовавшейся пленки, негативно окрашенный тушью. Микроскопировать с объективом 100х. Зарисовать.

3. Приготовить со дна накопительной культуры препарат «раздавленная капля», окрашенный раствором Люголя. Микроскопировать с объективом 40х. Зарисовать.

4. Провести качественную реакцию с хлорным железом на присутствие масляной кислоты. Описать результат реакции.

### Ход работы

Приготовление почвенного образца: образцы почвы помещают в стерильные пробирки, непосредственно в месте их сбора. Для разрушения почвенных агрегатов используют метод растирания почвы, увлажненной до пастообразного состояния в течение 5 минут в стерильной фарфоровой чашке резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке.

Нестерилизованную питательную среду разливают по 30 мл в колбы объемом 100-150 мл и вносят комочек почвы (1/2 чайной ложки), закрывают ватными пробками и термостатируют при 28...30<sup>0</sup>С. На 5...6 сутки на поверхности жидкости образуется бурая пленка. В некоторых случаях жидкость в колбе вспенивается и появляется запах масляной кислоты, что указывает на развитие в среде на дне колбы в анаэробных условиях бактерий *Clostridium pasteurianum*.

Для изучения морфологии микроорганизмов готовят два препарата:

- один из пленки с поверхности среды для выделения азотобактера. Делают фиксированный препарат, негативно окрашенный тушью. Микроскопируют с объективом 100х;
- второй из нижних слоев жидкости для выявления клостридий. Готовят препарат «раздавленная капля» с добавлением раствора Люголя (окрашивает гранулёзу). Микроскопируют с объективом 40х.

Для обнаружения масляной кислоты в среде 5 мл жидкой среды из накопительной культуры переносят в пробирку, добавляют 2 мл 2% раствора FeCl<sub>3</sub> и нагревают над пламенем до кипения. Пары образующегося раствора маслянокислого железа Fe(C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>COO)<sub>3</sub> в проходящем свете имеют кроваво-красный цвет.

### Материалы, представляемые в отчете

1. Описание характера роста выращенной культуры микроорганизмов
2. Зарисовка микропрепарата *Azotobacter chroococcum*
3. Зарисовка микропрепарата *Clostridium pasteurianum*
4. Описание результата реакции на обнаружение масляной кислоты

## **Техника безопасности**

При проведении практических занятий по получению накопительных культур различных микроорганизмов и изучению их свойств необходимо соблюдать правила, обязательные при работе с ЛВЖ, лабораторной стеклянной посудой и электрооборудованием.

### **Литература по теме занятия**

1. Шлегель Г. Общая микробиология. – М., Мир, 1987.
2. М.В. Гусев, Л.А. Минеева. Микробиология, 4-изд. М.: "Академия", 2003.
3. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С. Лабораторный практикум по общей микробиологии. - М., 1998.
4. Методы общей бактериологии в 3-х томах / Под ред. Ф.Герхардта и др. Пер. с англ. под ред. Е.Н.Кондратьевой и Л.В.Калакуцкого - М., Мир, 1983.
5. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Под ред. проф. Л.Б.Борисова и проф. А.М.Смирновой. - М., Медицина, 1994.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С.Егорова. – М., Изд-во МГУ им. М.В.Ломоносова, 1995.
7. Асонов Н.Р. Практикум по микробиологии. – М., Агропромиздат, 1988.
8. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М., Изд-во МГУ, 1991.
9. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М., Изд-во МГУ, 1989.
10. Лекции по разделу "Микроорганизмы как биогеохимические объекты".