Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

О. В. Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ
для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
35.03.04 Агрономия

Калининград
2023

УДК 579.2

Рецензент
кандидат биологических наук, доцент кафедры водных биоресурсов и аквакультуры ФГБОУ ВО «КГТУ» Е. А. Масюткина

Казимирченко, О. В. Микробиология: учеб.-методич. пособие по выполнению лабораторных работ для студ. бакалавриата по напр. подгот. 35.03.04 Агрономия / **О. В. Казимирченко.** – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 35 с.

Локальный электронный методический материал. Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ. Рекомендовано к использованию в учебном процессе методической комиссией института рыболовства и аквакультуры ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» университет» «13» февраля 2023 г., протокол № 10

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к использованию в качестве локального электронного методического материала в учебном процессе методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем 27 февраля 2023 г., протокол № 02

УДК 579.2
© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Казимирченко О.В., 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1 5
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2 7
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 9
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4 10
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 12
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 19
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7 29

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения дисциплины «Микробиология» является формирование знаний о мире микроорганизмов, особенностях их строения, физиологии, биохимических процессах, которые они возбуждают, роли почвенных микроорганизмов в почвообразовательных процессах.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- морфологию, систематику, физиологию, и экологию микроорганизмов;
- роль микроорганизмов в превращениях различных соединений и химических элементов в почве.

уметь:

- провести санитарно-микробиологическое исследование почвы, воды, воздуха;
- выделить и идентифицировать различные группы почвенных бактерий и микроскопических грибов, определить биологическую активность почвы.

владеть:

- специфическими правилами техники безопасности работы с микроорганизмами;
- навыками работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием;
- методами выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов;
- методиками микробиологического анализа различных почвенных образцов.

В результате прохождения лабораторных работ у студентов формируются умения по проведению санитарно-микробиологического исследования почвы, воды, воздуха, выделению и идентификации различных групп почвенных бактерий и микроскопических грибов, определению биологической активности почвы. Студенты приобретают навыки работы с живыми культурами микробов, микроскопическими препаратами, с питательными средами, лабораторным микробиологическим оборудованием, а также навыки по методам выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов, микробиологического анализа различных почвенных образцов.

Лабораторные работы по дисциплине проводятся в специализированной микробиологической лаборатории, отвечающей соответствующим требованиям. Выполнение работ осуществляется в лабораторных халатах при строгом соблюдении правил техники безопасности с живыми культурами микроорганизмов, спиртовыми горелками, микроскопами и другим лабораторным оборудованием.

Лабораторная работа №1.
Ознакомление с микробиологической лабораторией, оборудованием и техникой безопасности. Приготовление питательных сред. Тепловая стерилизация и подготовка посуды к ней.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям техники безопасности при работе с живыми культурами микроорганизмов; методам тепловой и холодной стерилизации, видам питательных сред, методам подготовки лабораторной посуды к стерилизации и приготовления питательных сред.

Задание по работе: прочитать и законспектировать правила работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории; подготовить чашки Петри, стеклянные пипетки к тепловой стерилизации; приготовить физиологический раствор и рыбопептонный агар, или иные питательные среды, требуемые для выполнения лабораторных работ, по усмотрению преподавателя; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: демонстрационный материал по видам микробиологической посуды, инструментам, расходным материалам, в том числе одноразового назначения, питательным средам; чашки Петри, пробирки биологические, ватно-марлевые пробки, рыбопептонный агар, хлорид натрия, электронные весы, электроплитка, шпатели, дистиллированная вода, мерные цилиндры.

Методические указания по выполнению работы.

1. Ознакомиться с правилами работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории. Внести личные данные и поставить подпись в Журнале регистрации инструктажа по охране труда на рабочем месте для студентов;
2. Завернуть в плотную бумагу чашки Петри и пипетки; перед заворачиванием пипеток в бумагу в конец пипетки, который помещается в дозатор, вставить ватный тампон на глубину не более 1 см. Посуда должна быть подготовлена таким образом, чтобы не оставалось не обернутых бумагой участков.
3. Подготовленную лабораторную посуду передать в стерилизационную комнату для проведения сухожаровой стерилизации;
4. В колбе приготовить 100 мл рыбо-пептонного агара: мерным цилиндром отмерить 100 мл дистиллированной воды, внести определенную навеску сухой питательной среды согласно прописи, указанной на банке со средой.
5. Содержимое колбы размешать, колбу поставить на электроплитку, среду довести до кипения, постоянно помешивая во избежание пригорания среды. Питательный агар прокипятить не менее трех раз до получения прозрачности раствора.
6. Горячий питательный агар в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть

бумажным колпачком, на котором написать название питательной среды, связать жгутом.

7. В колбе приготовить 100 мл физиологического раствора: в мерную колбу внести 0,9 г хлорида натрия NaCl, довести объем дистиллированной водой до 100 мл. Содержимое колбы тщательно перемешать.

8. Приготовленный физиологический раствор в объеме 10 мл разлить по пробиркам. Пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками. Собранные пробирки накрыть бумажным колпачком, на котором написать название среды, связать жгутом.

9. Подготовленные питательные среды передать в автоклавную для автоклавирования.

10. При необходимости приготовления иных питательных сред руководствоваться соответствующими прописями, указанными на таре, в которой находится питательная среда.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Подготовка посуды к стерилизации

Вид лабораторной посуды	Количество лабораторной посуды	Наименование и режим стерилизации лабораторной посуды

Таблица 2

Приготовление питательных сред

Наименование питательных сред	Объем и количество питательной среды (в зависимости от вида лабораторной посуды)	Рецептуры и способ приготовления питательных сред	Наименование и режим стерилизации питательных сред

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите о структуре микробиологической лаборатории и правилах работы и технике безопасности.

2. Что такое питательные среды? Каким требованиям они должны соответствовать?

3. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от состава?

4. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от физического состояния (консистенции)?

5. На какие группы подразделяются питательные среды в зависимости от назначения?

6. Что такое стерилизация? Какие виды стерилизации Вам известны? Что подвергается стерилизации в микробиологической практике?

7. Расскажите о методах стерилизации питательных сред.

8. Расскажите о методах стерилизации лабораторной посуды.

9. Расскажите о методах стерилизации инструментов и приборов.

10. Расскажите о стерилизации облучением. Для каких целей применяется этот метод?

Лабораторная работа №2
Культивирование микроорганизмов. Посев чистых культур бактерий и плесневых грибов на плотные питательные среды.

Цель работы: формирование умений и навыков по методам культивирования микроорганизмов на питательных средах, особенностям их роста на твердых и жидких питательных средах; отработке практических навыков пересева культур бактерий и плесневых грибов на твердые питательные среды.

Задание по работе: пересеять культуры бактерий методом «штриха» в пробирки на скошенный рыбопептонный агар и культуры плесневых грибов в чашку Петри с питательным агаром Сабуро; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: пробирки со стерильным скошенным рыбопептонным агаром, чашки со стерильным агаром Сабуро, пробирки с культурами бактерий (например, бактериями родов *Bacillus, Sarcina, Aeromonas*), чашки с культурами плесневых грибов (например, культуры плесневых грибов *Penicillium glaucum, Aspergillus niger, Mucor mucedo, Rhizopus nigricans*), карандаши (маркеры) по стеклу, бактериологические петли, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички.

Методические указания по выполнению работы.

1. В пламени спиртовки обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.

2. Охлаждённую петлю ввести в пробирку с культурой (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) и аккуратно взять часть бактериального налёта, старясь не повредить поверхность питательной среды. Обжечь горлышко и пробку, пробирку закрыть и поставить в штатив.

3. Отобранную культуру бактерий перенести в пробирку со стерильным питательным агаром (предварительно обжечь пробку и горлышко пробирки) в конец скоса. Культуру бактерий штрихом распределить по поверхности скоса снизу вверх, не повреждая питательную среду.

4. Обжечь пробку и горлышко пробирки, пробирку закрыть и поместить в штатив. Остатки культуры на петле сжечь в пламени, не допуская разбрызгивания.

5. В пламени спиртовки вновь обжечь бактериологическую петлю по всей длине металлической части.

6. Слегка приоткрыв крышку чашки Петри с выросшей колонией плесневого гриба, взять часть культуры охлаждённой бактериологической петлёй.

7. Закрыв чашку с культурой гриба, слегка приоткрыть чашку со стерильной средой Сабуро, ввести в неё петлю с культурой и сделать несколько штрихов по поверхности питательной среды. Штрихи наносить как можно ближе друг к другу, чтобы полностью засеять поверхность питательной среды в чашке Петри.

8. Остатки культуры плесневого гриба на петле сжечь в пламени спиртовки, не допуская разбрызгивания.

9. Засеянные пробирку и чашку Петри подписать карандашом (маркером) по стеклу с указанием латинского названия культуры микроорганизма, даты пересева, фамилии исполнителя.

10. Засеянные пробирки поместить в термостат с установленной температурой 37 ^{0}С, чашки Петри - с температурой 25 ^{0}С.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Пересев культуры бактерий

Наименование бактериальной культуры	Метод и техника пересева	Вид питательной среды для пересева	Условия инкубации культуры бактерий

Таблица 2

Пересев культуры плесневого гриба

Наименование культуры плесневого гриба	Метод и техника пересева	Вид питательной среды для пересева	Условия инкубации культуры плесневого гриба

Вопросы для самопроверки

1. Как осуществляют культивирование микроорганизмов?
2. Что такое посев и пересев культур микроорганизмов?
3. Расскажите о технике посева и пересева культур микроорганизмов.
4. Как осуществляют пересев культур бактерий или плесневых грибов на плотную питательную среду в чашку Петри?
5. Что такое культуральные признаки микроорганизмов?
6. Какие признаки учитывают при описании роста микроорганизмов в жидкой питательной среде?
7. Какие признаки учитывают при описании колоний микроорганизмов на плотной питательной среде в чашке Петри?
8. Какие признаки учитывают при описании колоний микроорганизмов на скошенном питательном агаре?

Лабораторная работа №3
Культуральные и морфологические признаки бактерий. Простые и сложные методы окраски. Микроскопия препаратов.

Цель работы: формирование умений и навыков по простым и сложным методам окраски бактерий, особенностям микроскопии окрашенных препаратов, изучению культуральных и морфологических признаков бактерий.

Задание по работе: изучить культуральные и морфологические признаки выросшей культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: выросшие культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре, набор красителей для окраски по методу Грама, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, бактериологическая петля, предметные стёкла, спиртовая смесь для обезжиривания предметных стекол или кусочки мыла, микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, вода, карандаши (маркеры) по стеклу, вата, марлевые салфетки, спиртовка, спирт этиловый, спички, песочные часы.

Методические указания по выполнению работы.

1. Охарактеризовать культуральные признаки выросшей культуры бактерий на скошенном рыбопептонном агаре.
2. На обезжиренном предметном стекле приготовить тонкий мазок из культуры бактерий, снятой бактериологической петлёй со скошенного питательного агара.
3. Мазок подсушить над пламенем спиртовки и зафиксировать в пламени.
4. Остуженный мазок окрасить по методу Грама.
5. Окрашенный препарат подсушить фильтровальной бумагой, по центру стекла нанести каплю иммерсионного масла.
6. Препарат, приготовленный из культуры бактерий, микроскопировать. Описать морфологические признаки бактерий (грампринадлежность, форма клеток, их взаимное расположение, наличие или отсутствие в клетках споры), клетки бактерий зарисовать.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Культуральные признаки бактерий (*указать таксономическую принадлежность*) со скошенного рыбопептонного агара

Интенсивность и характер роста культуры	Поверхность колонии, оптические свойства колонии	Цвет колонии	Край колонии	Консистенция культуры

Таблица 2

Морфологические признаки бактерий (*указать таксономическую принадлежность*) на окрашенном препарате

Грампринадлежность	Форма бактерий	Расположение бактерий	Наличие споры у бактерий и ее расположение	Рисунок препарата

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные формы бактериальных клеток.
2. Какое строение имеет бактериальная клетка?
3. Что такое споры бактерий, типы расположения споры в клетке?
4. Расскажите о способе приготовления фиксированного препарата из клеток бактерий.
5. Расскажите о технике окраски бактерий по методу Грама.
6. Как по окрашенному препарату различают грамположительные и грамотрицательные клетки бактерий?
7. Расскажите о технике микроскопирования окрашенного бактериального препарата.
8. Перечислите морфологические признаки бактерий, которые определяются при микроскопии мазка, окрашенного по Граму.

Лабораторная работа №4
Микроскопические грибы (дрожжи и плесневые грибы): культуральные и морфологические признаки.

Цель работы: формирование умений и навыков по особенностям строения и роста на питательных средах микроскопических дрожжевых и плесневых грибов.

Задание по работе: изучить морфологические признаки пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; охарактеризовать культуральные и морфологические признаки колоний плесневых грибов; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: биологический микроскоп, предметные и покровные стёкла, фуксин, вода, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, спиртовка, вода для промывания препарата, иммерсионное масло, бактериологическая петля, жидкая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, культуры плесневых грибов (*Aspergillus niger, Penicillium glaucum, Rhizopus nigricans, Mucor mucedo* или др.) в чашке Петри на плотной питательной среде Сабуро (или Чапека).

Методические указания по выполнению работы.

1. На обезжиренном предметном стекле приготовить тонкий мазок из жидкой культуры пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Мазок подсушить над пламенем спиртовки и зафиксировать в пламени.

4. Остуженный мазок окрасить фуксином в течение 2 минут, после препарат промыть водой.

5. Препарат подсушить фильтровальной бумагой, по центру стекла нанести каплю иммерсионного масла.

6. Препарат, приготовленный из культуры дрожжей, микроскопировать. Описать морфологические признаки клеток дрожжей: форма клеток, их взаимное расположение, наличие ядер, включений в цитоплазме клеток, наличие клеток в стадии почкования, наличие морфологически изменённых клеток. Препарат зарисовать.

7. Описать культуральные признаки культур плесневых грибов (*Aspergillus niger, Penicillium glaucum, Rhizopus nigricans, Mucor mucedo* или др.), выросших в чашках Петри на среде Сабуро (или Чапека): характер мицелия (плоский, бархатистый, рыхлый, волокнистый, бархатистый, пронизанный шерстистым мицелием), его цвет.

8. Провести микроскопию колоний плесневых грибов. Приготовить препарат «раздавленная капля»: на предметное стекло поместить каплю воды. В каплю двумя препаровальными иглами перенести часть мицелия плесени и хорошо отделить гифы, чтобы мицелий не был слишком плотным. Препарат покрыть покровным стеклом. При увеличении объектива микроскопа ×(x10) изучить общий вид плесени, рассмотреть подробное строение спорообразующего аппарата при увеличении объектива ×40. Препарат зарисовать. Колонии плесневых грибов также изучить микроскопированием на месте их роста в чашках Петри. Для этого поместить чашку с колонией плесневого гриба на столик микроскопа, открыть крышку чашки и микроскопировать культуру при малом увеличении объектива (×8-10). При этом во время микроскопирования живой культуры плесневого гриба около микроскопа должна гореть спиртовка.

9. Описать морфологические признаки культуры плесневого гриба: характер гиф (септированные или не септированные), характер спороношения (наличие спорангиев на спорангиеносцах, конидий и их расположение на конидиеносцах). Все виды плесневых грибов зарисовать в тетрадь с указанием таксономической принадлежности исследуемой культуры плесневого гриба.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Таблица 1

Морфологические признаки пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Форма клетки	Расположение клеток	Наличие вакуолей	Наличие почкующихся клеток	Рисунок препарата

Таблица 2

Культуральные признаки плесневых грибов

Вид плесневого гриба	Характер мицелия	Цвет мицелия	Тип роста на питательной среде

Таблица 3

Морфологические признаки плесневых грибов

Вид плесневого гриба	Характер гифы	Наличие органов спороношения	Рисунок препарата

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите о строении дрожжевой клетки, функциях клеточных структур.
2. Расскажите о размножении дрожжей способом почкования и деления.
3. Расскажите о бесполом и половом способах размножения дрожжей.
4. Расскажите о строении клетки плесневого гриба, функциях клеточных структур.
5. Расскажите о вегетативном способе размножения плесневых грибов.
6. Расскажите о бесполом и половом способах размножения плесневых грибов.
7. Перечислите культуральные признаки микроскопических грибов.
8. Назовите и охарактеризуйте методы определения морфологических признаков микроскопических грибов.

Лабораторная работа №5
Санитарно-микробиологические исследования питьевой воды и воздуха.

Цель работы: формирование умений и навыков по определению безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим показателям и санитарного состояния воздуха в лаборатории.

Задание по работе: провести санитарно-микробиологический посев водопроводной воды и воздуха в микробиологической лаборатории; определить нормируемые показатели качества водопроводной воды, провести сравнение полученных результатов с требованиями Санитарных правил и норм к питьевой воде централизованных систем питьевого водоснабжения, сделать вывод; рассчитать общую микробную обсемененность воздуха в лаборатории, сравнить с установленными требованиями, сделать вывод; изучить состав гетеротрофной микрофлоры воды и воздуха по культуральным и морфологическим признакам; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: стерильная посуда для отбора пробы воды с пробкой и бумажным колпачком, колба или пробирка для прогрева воды, стерильные чашки Петри, чашка с агаром Эндо, чашка с железосульфитным

агаром, пробирка с 10 мл расплавленного железосульфитного агара, пробирки с расплавленным рыбо-пептонным агаром, чашка с рыбо-пептонным агаром, пробирки со средой Гисса с лактозой, стерильные пипетки на 1 мл, дозаторы для пипеток, фильтрационная установка, баня водяная, прокипяченные мембранные фильтры для фильтрования воды, стеклянные цилиндры, стаканчик с этиловым спиртом, реактив для выявления фермента цитохромоксидазы, предметные стекла, набор красителей для окраски препаратов по методу Грама, биологический микроскоп, иммерсионное масло, пинцеты, вата, бактериологическая петля, песочные часы, фильтровальная бумага, стеклянная чаша со стеклянным мостиком, емкость с дезинфицирующим средством, спиртовка, спички, термостаты.

Методические указания по выполнению работы.

I. Отбор пробы воды.

Провести фламбрировку водопроводного крана, открыть кран и полном напоре воды спустить воду в течение 10 минут. Далее отобрать пробу воды в стерильный стаканчик.

II. Определение общего микробного числа воды (ОМЧ).

1. После тщательного перемешивания отобранной пробы воды стерильной пипеткой внести по 1 мл в две стерильные чашки Петри, слегка приоткрывая крышки.

2. После внесения воды в каждую чашку влить 10-12 мл расплавленного и остуженного до 45 °С рыбопептонного агара после фламбирования края пробирки, в которой находится питательная среда.

3. Быстро смешать содержимое чашек, равномерно распределяя по всему дну, избегая образования пузырьков воздуха, попадания питательного агара на края и крышку чашки.

4. Чашки оставить на лабораторном столе до застывания агара. После застывания агара чашки с посевами подписать, поместить в термостат вверх дном и инкубировать при температуре (37±1) °С в течение (24 ±2) ч.

5. После термостатирования посевов на чашках с питательным агаром подсчитать все выросшие колонии бактерий, наблюдаемые при увеличении в 2 раза. Учесть только те чашки, на которых выросло не более 300 изолированных колоний.

6. Количество колоний суммировать и разделить на два. Полученный результат выразить целым числом колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемой пробы воды, принимая во внимание следующие правила выражения результата анализа:

- если ни на одной из чашек нет роста бактерий, результат выражают как «менее 1 КОЕ/мл»;
- если среднеарифметическое количество колоний от 1 до 3, результат выражают как «менее 4 КОЕ/мл»;
- если среднеарифметическое количество колоний равно или более 4, результат выражают как фактическое содержание колониеобразующих единиц в 1 мл воды, т.е. от 4 КОЕ/мл и выше.

7. По росту колоний бактерий в чашке Петри на РПА определить процентное соотношение бактериальных форм в исследуемой воде: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посеве, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посеве, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

III. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП) методом мембранной фильтрации.

1. Провести подготовку фильтровального аппарата: воронку и столик фильтровального аппарата обтереть марлевым (ватным) тампоном, смоченным спиртом, и профламбировать.

2. На столик фильтровального аппарата профламбированным пинцетом положить стерильный мембранный фильтр, прижать его воронкой.

3. Провести фильтрование 3-х объемов воды по 100 мл или одного объема воды в количестве 300 мл. В воронку залить воду, включить насос, затем профильтровать необходимый объем воды, не допуская осушения фильтра.

4. После окончания фильтрования воды отключить вакуум, воронку снять. Стерильным пинцетом снять мембранный фильтр и перенести его, не переворачивая, на поверхность агара Эндо в чашку Петри. Фильтр поместить так, чтобы между фильтром и поверхностью среды не было пузырьков воздуха. При фильтровании трех объёмов воды аналогично размещают на поверхности агара Эндо все три мембранных фильтра.

5. Чашку со средой Эндо и фильтром подписать, поставить в термостат дном вверх и инкубировать при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч.

6. После термостатирования чашки с агаром Эндо и фильтром провести осмотр роста колоний бактерий на фильтре.

Если на фильтре (фильтрах) нет роста или выросли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, в протоколе анализа записать отрицательный результат анализа: «отсутствие обобщенных колиформных бактерий (ОКБ) и E. coli в 100 мл исследуемой воды».

Если на фильтрах обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или розового цвета колоний с отпечатком на обратной стороне фильтра, подсчитать число колоний каждого типа отдельно и приступить к подтверждению их принадлежности к обобщенным колиформным бактериям (ОКБ) и *E. coli*. Каждую подозрительную колонию бактерий исследовать по следующим тестам:

1) Наличие оксидазной активности (определение фермента цитохромоксидазы): на предметное стекло поместить кусочек фильтровальной бумаги, на бумагу нанести каплю смешанного реактива на оксидазу (1% -ный спиртовый α-нафтол и 1%-ный водный β-диметилпарафенилдиамин,

смешанные в соотношении 1:1) и в каплю бактериологической петлей внести часть колонии бактерий.

Реакция считается *положительной*, если в течение 1 мин появляется синее окрашивание культуры бактерий. При *отрицательной* реакции цвет в месте нанесения культуры не меняется.

Для дальнейшего изучения оставить только те колонии, которые дали отрицательный результат, так как БГКП не обладают ферментом цитохромоксидазой.

2) Отношение к окраске по Граму: из оксидазоотрицательных колоний приготовить фиксированный препарат, окрасить его по методу Грама и микроскопировать. Колиформные бактерии являются грамотрицательными бесспоровыми палочками.

3) Ферментация лактозы до кислоты и газа: оксидазоотрицательные грамотрицательные колонии бактерий пересеять методом укола параллельно в две пробирки с лактозной средой (среда Гисса с лактозой). Для определения *E. coli* среда предварительно должна быть прогрета до 43-44°С. Для подтверждения наличия ОКБ одну пробирку с посевом инкубируют при температуре (37±1) °С в течение 48 ч. Для подтверждения наличия *E. coli* вторую пробирку с посевом инкубируют при температуре (44±0,5) °С в течение 24 ч.

После термостатирования пробирок с лактозой провести учет результатов ферментации: при расщеплении лактозы до кислоты и газа происходит изменение цвета среды, образование пузырьков газа или разрывов среды.

7. Окончательный учет результатов анализа проводится по следующим критериям:

- выявление в питьевой водопроводной воде грамотрицательных палочек, не обладающих ферментом цитохромоксидазой, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С учитывается как присутствие ОКБ. Такие колонии выражают количеством КОЕ ОКБ, обнаруженных в 100 мл воды – «обнаружено … КОЕ ОКБ в 100 мл».

- выявление в питьевой водопроводной воде грамотрицательных палочек, не обладающих ферментом цитохромоксидазой, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 44 °С учитывается как присутствие *E. coli*. Такие колонии выражают количеством КОЕ *E. coli*, обнаруженных в 100 мл воды – «обнаружено … КОЕ ОКБ в 100 мл, из них … КОЕ *E. coli* в 100 мл».

- отсутствие роста колоний бактерий на фильтре или наличие в посеве грамположительных бактерий или отрицательные тесты на оксидазу или ферментацию лактозы указывают на отсутствие общих и (или) термотолерантных колиформных бактерий в 100 мл исследуемой пробы воды. Результат в этом случае выражают как «не обнаружено КОЕ *E. coli* в 100 мл» и (или) «не обнаружено КОЕ *E. coli* в 100 мл».

IV. <u>Определение спор сульфитредуцирующих клостридий.</u>

1. Перед посевом пробирки с железо-сульфитным агаром расплавить на водяной бане. В течение посева поддерживать питательную среду нагретой до 70-80 °С в водяной бане.

2. Отобранную пробу воды в количестве 20 мл прогреть на водяной бане в пробирках или колбах при температуре (75±5) °С в течение 15 мин для исключения вегетативных форм бактерий. При исследовании хлорированной воды прогревание пробы можно не производить.

3. Отобранный объем воды после прогревания профильтровать через мелкопористый мембранный фильтр в фильтрационной установке аналогично описанию выше.

4. После фильтрования мембранный фильтр фламбированным пинцетом взять за два противоположных края и согнутый в виде трубочки поместить в пробирку с горячим железосульфитным агаром. Сторона фильтра с осевшими бактериями должна быть обращена внутрь. При этом фильтр распрямляется и располагается по стенке пробирки. Сразу же после посева пробирку с железосульфитным агаром и фильтром для создания анаэробных условий быстро охладить путем помещения в емкость с холодной водой.

Можно произвести посев в чашку Петри. Для этого в стерильную чашку Петри, залитую тонким слоем железо-сульфитного агара, после фильтрации поместить мембранный фильтр фильтрующей поверхностью вниз так, чтобы под фильтром не было пузырьков воздуха. Затем чашку залить расплавленным железо-сульфитным агаром до верхнего края, чтобы крышка плотно прилегала к среде для создания анаэробных условий.

6. Посевы поместить в термостат и культивировать при температуре (44 ± 1) °С в течение 16-18 ч.

7. После термостатирования в пробирках или чашках с посевами на фильтре и в толще питательной среды учесть колонии черного цвета, характерные для сульфитредуцирующих клостридий, подсчитать их количество.

При отсутствии роста черных колоний на фильтре в протоколе анализа записать «спор сульфитредуцирующих клостридий не обнаружено в 20 мл воды».

При обнаружении роста черных колоний на фильтре в протоколе анализа записать «обнаружено … КОЕ спор сульфитредуцирующих клостридий в 20 мл воды».

V. <u>Определение санитарного состояния воздуха в лаборатории.</u>

1. Установить чашку с рыбопептонным агаром на любую горизонтальную поверхность на высоту около 1,6-1,8 м от пола.

2. Провести отбор пробы воздуха седиментационным методом: открыть крышку чашки Петри так, чтобы ребро крышки опиралось о ребро донышка чашки, но не перекрывало поверхность питательного агара.

3. Чашку оставить открытой на 15 минут. Затем закрыть крышку чашки, написать все данные об анализе и термостатировать посев на рыбо-пептонном агаре при температуре 37 ^{0}С в течение 48-72 ч.

4. После термостатирования на чашке с рыбопептонным агаром подсчитать число выросших колоний бактерий.

Расчет показателя общей бактериальной обсеменённости воздуха провести согласно расчету В. Л. Омелянского: на площадь 100 см^2 за 5 минут оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$X=\frac{N\cdot 100\cdot 1000\cdot 5}{S\cdot 10\cdot T}, \text{ КОЕ/м}^3,$$

где X – показатель общей микробной обсемененности воздуха;
100 – 100 см^2 площади (по Омелянскому);
1000 – пересчет на 1 м^3 воздуха;
5 – время экспозиции чашки (по Омелянскому);
S – площадь чашки Петри (63,6 см^2);
10 – 10 л воздуха (по Омелянскому);
T – время экспозиции чашки Петри при анализе (T=15 мин.).

5. По вышеприведенной формуле рассчитать нормируемый показатель чистоты воздуха, исходя из того, что в чистом воздухе число колоний бактерий в чашке не должно превышать 200.

Сравнить полученный результат бактериальной обсемененности воздуха с нормативным показателем, сделать вывод.

6. По росту колоний бактерий в чашке Петри с РПА определить процентное соотношение форм микроорганизмов в исследуемой пробе воздуха: подсчитать количество разнотипных колоний бактерий в посеве, описать их по культуральным (описание характера роста колонии бактерий на питательной среде) и морфологическим признакам (описание клеток бактерий на окрашенном препарате при микроскопии). Приняв за 100% общее число колоний в посеве, определить, сколько процентов составляет каждая морфологическая группа.

По общему количеству выросших колоний бактерий сделать заключение о содержании микроорганизмов в воздухе лаборатории, указать доминирующие группы микроорганизмов, указать мероприятия, способствующие поддержанию численности микроорганизмов в воздухе на уровне, не превышающем установленные нормативы.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о соответствии исследуемых проб воды и воздуха установленным микробиологическим нормативам безопасности и микробном фоне воды и воздуха.

Таблица 1.

Протокол санитарно-микробиологического исследования питьевой воды.

Микробиологический показатель	Нормируемое значение по СанПиН	Полученный результат
Общее микробное число воды, КОЕ/мл		
Обобщенные колиформные бактерии (ОКБ)		
E. coli		
Споры сульфитредуцирующих клостридий		

Таблица 2.

Микробный фон питьевой воды.

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посеве воды
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Таблица 3.

Протокол санитарно-микробиологического исследования воздуха в лаборатории.

Микробиологический показатель	Нормируемое значение	Результат анализа
Общее бактериальная обсемененность воздуха, КОЕ/м^3		
Количество колоний бактерий		

Таблица 4.

Микробный фон воздуха.

Культуральные признаки	Морфологические признаки	Доля колоний (%) каждого типа в посеве пробы воздуха
Колонии бактерий I типа		
Колонии бактерий II типа		

Вопросы для самопроверки

1. С какой целью осуществляют санитарно-микробиологическое исследование проб питьевой воды и воздуха?
2. Расскажите о правилах отбора проб питьевой воды на микробиологическое исследование.

3. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют в питьевой воде централизованных систем питьевого водоснабжения? Каковы их нормируемые значения?

4. Расскажите о методе определения общего микробного числа воды.

5. Расскажите о методе определения общих колиформных и термотолерантных колиформных бактерий в питьевой воде.

6. Расскажите о методе определения спор сульфитредуцирующих клостридий в питьевой воде.

7. Расскажите об определении санитарного состояния воздуха с применением седиментационного метода отбора. Преимущества и недостатки данного метода отбора проб.

8. Какие санитарно-микробиологические показатели определяют обычно в воздухе помещений? Каковы их нормируемые значения?

9. Расскажите об определении общего микробного числа воздуха при применении седиментационного метода отбора?

Лабораторная работа №6
Биохимические процессы, вызываемые микроорганизмами.

Цель работы: формирование умений и навыков по изучению роли микроорганизмов в круговороте углерода, азота, фосфора, серы, почвообразовательных процессах.

Задание по работе: провести опыты по спиртовому, молочнокислому, маслянокислому брожениям, гниению (аммонификации) белка, денитрификации, азотфиксации, сульфатредукции. Описать результаты опытов, используя данные визуальных наблюдений за сосудами, качественных реакций на продукты реакции, выделить группы микроорганизмов-возбудителей процесса, определить их морфологические признаки, особенности роста в экспериментальных условиях; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование:

Для спиртового брожения. Питательная среда состава, г: сахароза – 15,0; пептон – 0,5; KH_2PO_4 – 0,3; $MgSO_4$ – 0,1; вода дистиллированная – 100 мл. Колба Эрленмейера или плоскодонная колба на 200-300 мл с затвором Мейсля с серной кислотой H_2SO_4 (рис. 37), сухие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, электронные весы, 0,1%-ный водный раствор NaOH, йод кристаллический, пробирка биологическая, держатель для пробирок, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, раствор фуксина, микроскоп, иммерсионное масло.

Для молочнокислого брожения. Свежее или пастеризованное молоко, колбочки на 50 мл, 0,1 N раствор NaOH, раствор фенолфталеина, бюретка на 50 мл, стакан стеклянный лабораторный типа В или Н вместимостью 100 мл, пипетка градуированная на 10 мл, спирт этиловый или спирто-эфирная смесь

1:1, электроплитка, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, раствор метиленового синего, микроскоп, иммерсионное масло.

Для маслянокислого брожения глюкозы. Питательная среда (500 мл): мясо-пептонный бульон с добавлением 3% глюкозы. Круглодонная колба на 500 мл, резиновая пробка с резиновым шлангом и зажимом, вакуумный насос Комовского (рис. 38, а, б), почва, мел, электроплитка, пробирка биологическая, пипетка градуированная на 1 мл, 5%-ный раствор хлорного железа, держатель для пробирок, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Для маслянокислого брожения пектиновых веществ. Льняная соломка, нитка, пробирки биологические, ватно-марлевая пробка, держатель для пробирок, 5%-ный раствор хлорного железа, скальпель, пинцет, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Для аммонификации белка. Питательная среда (100 мл): мясо-пептонный бульон. Колба Эрленмейера на 100 мл, ватно-марлевая пробка, кусочек мяса, фильтровальная бумага, смоченная щелочным раствором ацетата свинца ($Pb(CH_3COO)_2$), фильтровальная бумага, смоченная насыщенным раствором щавелевой кислоты, универсальная индикаторная бумага, пергаментная бумага или полиэтиленовый пакет, резинка или нитка, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло, вода дистиллированная.

Для азотфиксации. Питательная среда Эшби состава, г: сахароза – 2,0; KH_2PO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $FeSO_4$ – 2 капли 1%-ного раствора, $CaCO_3$ – 0,05, вода дистиллированная – 100 мл. Колба Эрленмейера на 100 мл, ватно-марлевая пробка, почва или сточная вода, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Для денитрификации. Питательная среда состава,г: сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или цитрат натрия – 20; KNO_3 – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – следы, вода дистиллированная – 100 мл. Колба Эрленмейера на 100-200 мл, почва, каучуковая или резиновая пробка со стеклянной трубкой, вазелиновое масло, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Для сульфатредукции. Питательная среда Ван-Дельдена состава, г/л: натрий молочнокислый (можно заменить виннокислым, яблочнокислым или янтарнокислым натрием) – 5,0; аспарагин – 1,0; $MgSO_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; значение pH среды доводят до 7,0; затем к среде добавляют 0,1-0,5 г лимоннокислого железа, вода дистиллированная – 1000 мл. Колба Эрленмейера на 50мл, резиновая пробка почва, ил или вода исследуемого водоема, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло.

Методические указания по выполнению работы.

Постановка опыта спиртового брожения.

1. В колбу Эрленмейера со 100 мл питательной среды внести 1-2 г сухих пекарских дрожжей. Колбу закрыть резиновой пробкой с затвором Мейсля (рис. 37).

2. Колбу взвесить на электронных весах с точностью до 0,01 г, вес колбы записать в тетрадь.

3. Колбу поместить в термостат при температуре 25 ^{0}С на 3-4 суток.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения: образование пены в колбе, характерный запах бражки.

2. Взвесить колбу, не снимая резиновую пробку с затвором Мейсля, и по разнице массы колбы до и после брожения определить массу выделившегося углекислого газа.

3. Рассчитать количество образовавшегося этилового спирта и сброженного сахара, исходя из массы выделившегося углекислого газа в соответствии с уравнением спиртового брожения.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + nАТФ$$

	глюкоза	этиловый спирт	диоксид углерода
Молекулярные массы	180	92 (2×46)	88 (2×44)

Пример расчёта. В процессе брожения образовалось 6 г CO_2. Находим массы выделившегося спирта (х) и сброженного сахара (у):

88 г CO_2 соответствуют 92 г CH_3CH_2OH

6 г CO_2 » х г CH_3CH_2OH

$$x=\frac{6\cdot 92}{88}=6{,}3\ (г)$$

88 г CO_2 соответствуют 180 г $C_6H_{12}O_6$

6 г CO_2 » у г $C_6H_{12}O_6$

$$x=\frac{6\cdot 180}{88}=12{,}3\ (г)$$

4. Провести качественную реакцию на этиловый спирт: в биологическую пробирку налить часть сброженной жидкости, подщелочить ее 1%-ным водным раствором NaOH, нагреть до 60 ^{0}С и, добавив кристаллик йода, прокипятить. В присутствии этилового спирта в осадок выпадают мелкие светло-жёлтые кристаллы йодоформа, имеющего характерный резкий сладковатый запах. Процесс проходит по следующей схеме:

$$CH_3CH_2OH + I_2 \rightarrow CH_3CHO + 2HI$$

$$CH_3CHO + 3I_2 \rightarrow CI_3CHO + 3HI$$

$$CI_3CHO + NaOH \rightarrow \underset{\text{йодоформ}}{CHI_3} + HCOONa$$

Результаты реакции записать в тетрадь.

5. Провести микроскопирование сброженной жидкости: на обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей нанести каплю сброженной жидкости вместе с осадком, сделать тонкий мазок, подсушить, зафиксировать, окрасить раствором фуксина в течение 2 минут, стекло промыть водой. Окрашенный препарат микроскопировать с каплей иммерсионного масла. При микроскопии препарата отметить форму дрожжей, их размеры, расположение клеток, наличие в клетках ядер, рассмотреть оболочку, найти почкующиеся клетки. Препарат зарисовать, на рисунке отметить структуры клетки, под рисунком подписать латинское название пекарских дрожжей.

Постановка опыта молочнокислого брожения.

1. В две колбочки налить свежее или пастеризованное молоко, закрыть ватно-марлевыми пробками, одну из колб прокипятить. Колбы с не кипячёным и кипячёным молоком поместить в термостат при температуре 30 ^{0}С на 48 ч.

2. Определить начальную кислотность молока: в коническую колбу вместимостью 150-200 см^3 отмерить 10 мл свежего или пастеризованного молока, добавить 20 мл дистиллированной воды и 3 капли фенолфталеина. Смесь тщательно перемешать и провести титрование 0,1 N раствором гидроксида натрия NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Количество щёлочи, пошедшее на титрование свежего или пастеризованного молока, записать в тетрадь.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения в колбе с не кипячёным и кипячёным молоком: характер и цвет сгустка, запах.

2. Провести микроскопирование сброженной жидкости: приготовить препараты из прокисшего не кипячёного и кипячёного молока. Для этого бактериологическую петлю ввести в сгусток и, повернув вокруг оси, извлечь, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень (*при её наличии на поверхности скисшего молока*). Сгусток распределить по предметному стеклу очень тонким слоем без воды, препарат высушить на воздухе, затем зафиксировать смесью спирта этилового с эфиром (1:1) или этиловым спиртом, несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации извлекается и удаляется жир молока, капли которого мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрасить метиленовым синим в течение 2-3 минут, промыть водой, высушить и микроскопировать. На препарате отметить мелкие кокковые клетки, соединённые в цепочки, *Streptococcus lactis* – возбудитель естественного скисания молока, который способствует накоплению в молоке до 1% молочной кислоты. На препарате также могут встретиться тонкие палочки правильной формы, иногда содержащие зёрна волютина – *Lactobacillus bulgaricus* - возбудитель естественного скисания молока в южных широтах, кислотоустойчивые, накапливают до 3,5% молочной кислоты.

На препаратах из прокисшего кипячёного молока могут регистрироваться споровые маслянокислые клостридии *Clostridium pasteurianum* – толстые палочки, некоторые могут быть со спорами клостридиального или плектридиального типа. Если на поверхности прокисшего молока появилась белая бархатистая плёнка, то в мазке обнаруживаются прямоугольные или овальные клетки молочной плесени, которые отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных микроорганизмов. В тетради также записать уравнения реакций гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения.

3. Определить кислотность молока после скисания аналогично описанию выше. По разнице количества щелочи, пошедшего на титрование молока до и после сбраживания, сделать вывод о накоплении в субстрате молочной кислоты.

Постановка опыта маслянокислого брожения глюкозы.

1. В круглодонную колбу со 100 мл питательной среды внести 1-2 г почвы, щепотку мела; колбу пастеризовать на кипящей водяной бане в течение 15 минут.

2. После пастеризации колбу закрыть резиновой пробкой с резиновым шлангом, который соединить со шлангом насоса Комовского. Колбу обернуть полотенцем и, качнув колесо насоса не более трёх раз, откачать из колбы воздух.

3. Пережать резиновый шланг зажимом и отсоединить его от насоса. Колбу поместить в термостат на 7-10 суток при температуре 25-27 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения: наличие пены (газообразования), характерный запах масляной кислоты.

2. Провести качественную реакцию на масляную кислоту: в биологическую пробирку налить 3-5 мл сброженной жидкости, добавить 1-2 мл 5%-ного хлорного железа, вставить пробирку в держатель и жидкость слегка подогреть. В присутствии масляной кислоты образуется маслянокислое железо оранжево-бурого цвета, которое выпадает в осадок. В тетрадь записать результаты проведённой качественной реакции и уравнение реакции.

3. Провести микроскопирование сброженной жидкости: маленькую каплю сброженной жидкости поместить на покровное стекло, подкрасить раствором Люголя. Покровное стекло поместить каплей над луночкой предметного стекла так, чтобы капля не касалась предметного стекла. Края покровного стекла смазать вазелином, чтобы уменьшить испарение и сохранить в препарате анаэробные условия. На поверхность покровного стекла нанести каплю иммерсионного масла. При микроскопии препарата отметить форму маслянокислых бактерий *Clostridium pasteurianum*, их расположение, наличие цепочек, подвижность, окраску вегетативных клеток и клеток со спорами. Микроскопический препарат можно приготовить на предметном стекле с последующей фиксацией и окраской мазка по методу Грама.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать уравнение реакции маслянокислого брожения глюкозы.

Постановка опыта маслянокислого брожения пектиновых веществ.

1. Связать ниткой снопик из льняной соломки, опустить его в биологическую пробирку с водопроводной водой.

2. Вставить пробирку в держатель и кипятить 2-3 минуты для удаления экстрактивных (легкосбраживаемых) веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Вода приобретает жёлто-зелёный цвет.

3. Воду из пробирки слить, вновь наполнить пробирку водопроводной водой, кипятить несколько минут и воду слить. Так поступают несколько раз до тех пор, пока вода не перестанет окрашиваться.

4. После последнего кипячения жидкость оставить в пробирке, охладить пробирку под струей водопроводной воды, и в снопик ввести свежую соломинку, не подвергшуюся нагреванию.

5. Пробирку со снопиком поставить в термостат на 7 суток при температуре 30-35 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки брожения: наличие газообразования.

2. Провести качественную реакцию на масляную кислоту с хлорным железом (см. учёт результатов опыта по маслянокислому брожению глюкозы). В тетрадь записать результаты проведённой качественной реакции.

3. Провести микроскопирование сброженной жидкости: пинцетом извлечь снопик льняной соломки из пробирки, поместить его на обезжиренное предметное стекло. Скальпелем разрезать несколько соломинок и выжать из них жидкость. Соломинку убрать со стекла, жидкость на стекле высушить. Препарат зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии обратить внимание на грамположительные крупные палочковидные бактерии *Clostridium pectinovorum* с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка) и палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце клетки - *Cl. felsineum*. У пектиновых бактерий отметить прерывистое расположение гранулёзы в клетке, окрашенной в синий цвет.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать уравнения реакций маслянокислого брожения пектина.

Постановка опыта аммонификации белковых веществ (гниения).

1. В колбу Эрленмейера с 30 мл питательной среды добавить 1/3 чайной ложки почвы.

2. Под ватно-марлевую пробку подвесить лакмусовую бумажку, смоченную дистиллированной водой, для обнаружения выделяющегося аммиака, а также индикаторные бумажки, пропитанные уксуснокислым свинцом и щавелевой кислотой, для обнаружения выделяющихся сероводорода

и индола, соответственно. Бумажки не должны касаться питательной среды и друг друга.

3. Колбу закрыть ватно-марлевой пробкой, сверху пробку затянуть пергаментной бумагой или полиэтиленовым пакетом и поместить в термостат на 5-6 суток при температуре 28-30 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки процесса в колбе: отметить наличие постороннего (часто – тошнотворного) запаха и изменение окраски лакмусовой и индикаторных бумажек. При выделении аммиака лакмусовая бумага окрашивается в синий цвет, при выделении сероводорода фильтровальная бумага, смоченная ацетатом свинца, чернеет; если она покрывается серебристым налётом, значит, наряду с H_2S выделяются еще и меркаптаны (например, метилмеркаптан CH_3SH). При образовании индола лакмусовая бумага, смоченная насыщенным раствором щавелевой кислоты, окрашивается в розовый цвет.

2. Провести микроскопирование жидкости из колбы: на обезжиренное предметное стекло нанести каплю субстрата из колбы, препарат высушить, зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии можно обнаружить грамотрицательные палочковидные бесспоровые гнилостные бактерии *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, аэробные споровые бактерии рода *Bacillus*, анаэробные палочки рода *Clostridium* с клостридиально расположенными спорами.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать схему гидролиза белка и уравнения реакций распада аминокислот с учетом выявленных продуктов аммонификации.

Постановка опыта азотфиксации.

1. В колбу Эрленмейера налить тонким слоем питательную среду Эшби, заразить почвой или сточной водой.

2. Колбу закрыть ватно-марлевой пробкой и поместить в термостат на 7-10 суток при температуре 25-30 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки процесса в колбе: отметить бурую плёнку азотобактера, которая поднимается по стенкам колбы, наличие пенообразования и запаха масляной кислоты в колбе (признак развития анаэробных маслянокислых клостридий).

2. Провести микроскопирование жидкости из колбы: приготовить два препарата – один из плёнки, другой – из жидкости со дна колбы. Препараты высушить, зафиксировать, окрасить по методу Грама. При микроскопировании препарата из плёнки найти крупные овальные клетки бактерий рода *Azotobacter*, отметить отсутствие спор, возможное наличие капсулы вокруг клеток. Во втором препарате зарегистрировать грамположительные палочки *Clostridium*

pasteurianum, образующие споры клостридиального типа (палочка веретенообразной формы). Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать схему азотфиксации.

Постановка опыта денитрификации.

1. В колбу Эрленмейера, содержащую небольшое количество питательной среды, добавить 1/3 чайной ложки почвы. Среду тщательно перемешать с почвой для удаления пузырьков воздуха.

2. Затем в колбу долить питательную среду до края и закрыть каучуковой или резиновой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, расширенная в средней части. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку. Под пробкой не должно оставаться пузырьков воздуха (рис. 40).

3. В стеклянную трубку налить вазелиновое масло небольшим слоем для создания анаэробных условий.

4. Колбу поместить в термостат на 5-6 суток при температуре 28-30 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки процесса в колбе: отметить появление пузырьков газа под пробкой, изменение цвета среды.

2. Провести микроскопирование жидкости из колбы: из середины субстрата стерильной стеклянной пипеткой взять каплю жидкости и приготовить фиксированный и окрашенный по методу Грама препарат. При микроскопии рассмотреть бесспоровые грамотрицательные бактерии сферической формы *Paracoccus denitrificans* и мелкие палочки *Pseudomonas stutzeri*.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунками подписать латинские названия обнаруженных бактерий. В тетради также записать схему денитрификации.

Постановка опыта сульфатредукции.

1. В колбу Эрленмейера налить 30 мл питательной среды, заразить водой из загрязнённого водоема, сероводородным илом или почвой.

2. Колбу закрыть резиновой пробкой со стеклянной трубкой, расширенной в середине, таким образом, чтобы пробка вытеснила часть жидкости в трубку. К жидкости в трубке добавить слой вазелинового масла для создания анаэробных условий.

3. Колбу поместить в термостат на 7-10 суток при температуре 28-30 ^{0}С.

Учет результатов анализа.

1. Записать внешние признаки процесса в колбе: отметить окрашивание среды в чёрный цвет и наличие запаха сероводорода.

2. Провести микроскопирование жидкости из колбы: на обезжиренное предметное стекло нанести каплю субстрата из колбы, препарат высушить, зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии следует рассмотреть грамотрицательные не споровые слегка изогнутые палочки бактерий *Desulfovibrio desulfuricans*.

Результаты микроскопии зарисовать в тетрадь, под рисунком подписать латинское название обнаруженных бактерий. В тетради также записать схему сульфатредукции.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы о характере течения биохимических процессов и участвующих в них группах микроорганизмов.

Таблица 1

Учет результатов спиртового брожения

Описание внешних признаков брожения в колбе (пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Расчет количества сброженного сахара и образовавшегося этилового спирта	Химическое уравнение брожения	Вывод

Таблица 2

Учет результатов молочнокислого брожения

Описание внешних признаков брожения в колбе (характер и цвет сгустка, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Расчет кислотности молока до и после брожения	Химическое уравнение брожения	Вывод
не кипяченое молоко				
кипяченое молоко				

Таблица 3

Учет результатов маслянокислого брожения глюкозы

Описание внешних признаков брожения в колбе (пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Результаты качественной реакции на масляную кислоту	Химическое уравнение брожения	Вывод

Таблица 4

Учет результатов брожения пектина

Описание внешних признаков брожения в колбе (пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Результаты качественной реакции на масляную кислоту	Химическое уравнение брожения	Вывод

Таблица 5

Учет результатов аммонификации белков

Описание внешних признаков процесса в колбе (запах)	Образование продуктов распада белка	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Схема гидролиза белка	Химические уравнения реакций распада аминокислот	Вывод
	выделение NH_3, H_2S, образование индола				

Таблица 6

Учет результатов азотфиксации

Описание внешних признаков процесса в колбе (пленка азотобактера, пена, запах)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Схема азотфиксации	Вывод

Таблица 7

Учет результатов денитрификации

Описание внешних признаков процесса в колбе (газообразование, цвет среды)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Схема денитрификации	Вывод

Таблица 8

Учет результатов сульфатредукции

Описание внешних признаков процесса в колбе (запах, цвет среды)	Описание микроскопического препарата, рисунок препарата	Схема сульфатредукции	Вывод

Вопросы для самопроверки

1. Напишите уравнение реакции спиртового брожения. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеет этот процесс?

2. Напишите уравнения реакций молочнокислого брожения. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеет этот процесс?

3. Напишите уравнения реакций маслянокислого брожения глюкозы и пектина. Назовите и охарактеризуйте возбудителей брожений. Какое практическое значение имеют данные процессы для почв?

4. Напишите схему микробиологического распада белка, уравнения реакций образования продуктов распада аминокислот. Назовите и охарактеризуйте возбудителей аммонификации (гниения) белка. Какое практическое значение имеет этот процесс для почв?

5. Напишите схему азотфиксации. Назовите и охарактеризуйте возбудителей процесса. Какое практическое значение имеет процесс азотфиксации для почв?

6. Напишите схему денитрификации. Назовите и охарактеризуйте возбудителей процесса. Какое практическое значение имеет процесс денитрификации для почв?

7. Напишите схему сульфатредукции. Назовите и охарактеризуйте возбудителей процесса. Какое практическое значение имеет процесс сульфатредукции для почв?

Лабораторная работа №7
Микробиологический анализ почвы.

Цель работы: формирование умений и навыков по определению общей бактериальной обсемененности почвы и состава ее микрофлоры; выявлению разнообразия микрофлоры почвы при микроскопии стекла обрастания.

Задание по работе: провести микробиологический посев пробы почвы методом серийных десятикратных разведений; рассчитать общую бактериальную обсемененность почвы, изучить микробный фон почвы по разнотипным колониям бактерий и микроскопических грибов, выросшим на питательных средах, выявить некоторые физиолого-биохимические свойства бактерий; изучить состав микрофлоры почвы при микроскопии стекла обрастания; заполнить отчет о работе в табличной форме, сделать выводы.

Материалы и оборудование: проба почвы, колба и пробирки с физиологическим раствором, стерильные чашки Петри, расплавленный рыбопептонный агар в пробирках, расплавленный агар Сабуро в пробирках, стерильные пипетки, дозаторы для пипеток, предметные стекла, стаканчик с исследуемым грунтом, счётчик для подсчёта колоний, весы электронные, бактериологическая петля, спиртовка, 5%-ный раствор эритрозина на 5%-ной

карболовой воде, набор красителей для окраски по методу Грама, микроскоп, иммерсионное масло, реактив для определения наличия цитохромоксидазы, бумага фильтровальная, 3,5%-ный водный раствор перекиси водорода, пробирки со стерильным скошенным агаром, рыбопептонным желатином (РПЖ), полужидким агаром (ПЖА), средой Гисса с глюкозой, идентификационные таблицы и определители для установления таксономической принадлежности бактерий и плесневых грибов.

Методические указания по выполнению работы.

1. Взвесить 10 г исследуемой почвы и перенести в колбу с 90 мл физиологического раствора (разведение 1:10). Содержимое колбы тщательно перемешать. После перемешивания дать частицам почвы осесть в течение одной-двух минут.

2. Стерильной пипеткой 1 мл суспензии из колбы перенести в первую пробирку с 9 мл физиологического раствора (разведение 1:100). Конец пипетки следует опускать в пробирку с физиологическим раствором не более чем на 3 мм, чтобы не смыть бактерий с ее поверхности.

3. Другой стерильной пипеткой размешать содержимое пробирки разведения 1:100 путем многократного втягивания суспензии в пипетку и ее последующего выдувания. Затем 1 мл суспензии перенести в следующую пробирку с 9 мл физиологического раствора (разведение 1:1000). Далее аналогичным образом провести последующие разведения грунта до получения разведения 1:1000000.

4. После приготовления разведений провести высев суспензии на питательные среды глубинным способом. Для этого из соответствующих разведений провести высев по 1 мл суспензии в стерильные чашки Петри (из каждого разведения по четыре чашки). При высеве суспензии разрешается пользоваться одной пипеткой, но высев следует проводить, начиная с наибольшего (последнего) разведения.

5. Суспензию в двух чашках Петри каждого разведения залить расплавленным и охлажденным до 40-45 ^{0}С РПА, в двух других чашках Петри аналогичного разведения залить расплавленным и охлажденным до 40-45^{0}С агаром Сабуро.

6. Посевы на РПА поместить в термостат, перевернув чашки донышком вверх, при температуре 30°С на 72 ч, на агаре Сабуро - при температуре 25 ^{0}С на 5 суток.

7. Для определения микробного пейзажа почвы методом стёкол обрастания подготовить стерильное предметное стекло, которое погрузить вертикально эксикатор с исследуемой почвой. Стекло оставить в почве на 7 суток при комнатной температуре.

<u>Учет результатов анализа.</u>

1. По каждому разведению подсчитать число выросших колоний бактерий в чашках Петри с РПА в каждой чашке, рассчитать среднеарифметическое число колоний. При массивном росте колоний бактерий карандашом следует

разделить чашку на несколько равных секторов и просчитать число колоний бактерий в одном секторе чашки, после чего умножить на количество секторов.

2. Провести расчет общей бактериальной обсемененности (ОБО) почвы по формуле:

$$\text{ОБО почвы} = \frac{\text{число колоний бактерий в чашке Петри}}{\text{объем внесенной суспензии в чашку}} \cdot 10^{n}, \text{ КОЕ/г},$$

где 10^{n} – степень разведения навески почвы.

Рассчитав показатель по каждому разведению, вывести среднее значение общей бактериальной обсемененности исследуемого грунта.

3. В чашках с РПА выделить доминирующий тип колонии бактерий, описать её культуральные признаки. Колонию пересеять на скошенный рыбопептонный агар для накопления бактериальной массы. Пробирку со скошенным рыбопептонным агаром поместить в термостат при температуре 37 ^{0}С на 24-48 ч.

4. Со скошенного рыбопептонного агара приготовить мазок на обезжиренном предметном стекле, мазок зафиксировать и окрасить по методу Грама. При микроскопии описать морфологические признаки бактерий, определить грампринадлежность, убедиться, что культура бактерий чистая, т.е. представлена однотипными по морфологическим признакам клетками.

5. Культуру бактерий со скошенного агара проверить на наличие ферментов цитохромоксидазы и каталазы.

Для выявления у бактерий фермента *цитохромоксидазы* часть культуры бактерий бактериологической петлей перенести на кусочек фильтровальной бумаги и слегка растереть в капле смешанного реактива, состоящего из равных частей 1%-ного спиртового раствора α-нафтола и 1%-ного водного раствора β-диметилпарафенилендиамина. Реакцию учесть в течение одной минуты. При наличии фермента оксидазы культура бактерий окрашивается в синий цвет, при ее отсутствии – цвет колонии не меняется.

Для выявления фермента *каталазы* на предметное стекло нанести каплю 3,5%-ной перекиси водорода. Внести в нее бактериологическую петлю с культурой бактерий и выдержать несколько секунд. При наличии каталазы вследствие выделения газообразного кислорода колония бактерий начинает «пениться» (выделяются пузырьки газа), при отсутствии каталазы – выделение пузырьков газа отсутствует.

6. Культуру бактерий со скошенного агара пересеять методом укола в столбики питательных сред: рыбопептонный желатин (РПЖ), полужидкий агар (ПЖА), среду Гисса с глюкозой. Пробирки поместить в термостат при температуре 37 ^{0}С на 24-48 ч.

7. После термостатирования на питательных средах учесть физиолого-биохимические признаки бактерий.

На *рыбопептонном желатине* определить наличие у бактерий фермента протеазы, необходимого для усвоения белка. Учет реакции провести после выдерживания пробирки с РПЖ в холодной воде или холодильнике. Если под действием фермента протеазы произошло расщепление белков желатина,

отмечается разжижение питательной среды. Затвердение желатина в пробирке свидетельствует об отсутствии у бактерий протеолитического фермента.

На среде Гисса с глюкозой учесть способность бактерий ферментировать глюкозу, определить подвижность и отношение бактерий к кислороду.

При ферментации бактериями глюкозы происходит изменение цвета среды в пробирке. При выделении газа в пробирке появляются пузырьки или происходят разрывы в столбике среды.

Подвижность бактерий определяют по росту в столбике питательной полужидкой среды. Подвижные бактерии вырастают на всей поверхности среды и (или) вызывают ее диффузное помутнение, неподвижные – растут строго по уколу.

При определении *отношения бактерий к кислороду* также анализируют характер роста бактерий в столбике полужидкой среды. *Аэробы*, развитие которых происходит в атмосфере кислорода, растут поверхностной пленкой. *Анаэробы*, не нуждающиеся в кислороде, растут в глубине среды, у дна пробирки. *Факультативные анаэробы*, размножение которых может происходить как при наличии, так и в отсутствие молекулярного кислорода, растут в виде поверхностной пленки и равномерно по всему уколу. *Микроаэрофильные* бактерии, требующие для своей жизнедеятельности малое количество кислорода только на первых этапах развития, растут в верхней трети столбика полужидкой среды.

По совокупности полученных признаков изучаемых культур бактерий определить таксономическое положение выделенной культуры, используя идентификационные таблицы.

8. Провести учет роста плесневых и дрожжевых грибов на агаре Сабуро. Описать культуральные и морфологические признаки микроскопических грибов и выявить их таксономическую принадлежность по определителю.

Рост *дрожжевых грибов* сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, розоватых, серовато-белых или другого цвета колоний с гладкой поверхностью и ровными краями. Для подтверждения роста дрожжей на агаре Сабуро необходимо приготовить микроскопический препарат, окрашенный фуксином.

Плесневые грибы на поверхности агара Сабуро образуют пушистый или плоский мицелий различной окраски. Для идентификации плесневых грибов провести микроскопию колонии гриба при малом увеличении микроскопа (×8-10) с целью выявления строения спороносящих гиф и органов спороношения.

9. Исследовать состав микрофлоры почвы на стекле обрастания: стекло извлечь из почвы, протереть одну из сторон стекла ватой. Другую сторону стекла подсушить на воздухе или над пламенем спиртовки, зафиксировать спиртом и окрасить 5%-ным раствором эритрозина на 5%-ной карболовой воде (продолжительность окрашивания 30-40 минут) или по методу Грама. Затем стекло микроскопировать в нескольких полях зрения. Описать морфологические формы микроорганизмов, препарат зарисовать.

Форма предоставления отчётных материалов.

По результатам проделанной работы заполнить таблицы, сделать выводы.

Микробиологическое исследование почвы

Таблица 1

Определение общей бактериальной обсеменённости почвы.

Количество колоний бактерий в чашке с РПА						Общая бактериальная обсемененность почвы, КОЕ/г
1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000	

Таблица 2

Культуральные и морфологические признаки колоний бактерий каждого типа с РПА.

Культуральные признаки колонии бактерий	Морфологические признаки колонии бактерий, рисунок препарата
Колонии I типа	
Колонии II типа	

Таблица 3

Физиолого-биохимические признаки колонии бактерий с чашки с РПА, таксономическая принадлежность бактерий.

Тип колонии	Физиологические признаки на ПЖА		Наличие фермента оксидазы	Наличие фермента каталазы	Разжи-жение желатина на РПЖ	Ферментация глюкозы на среде Гисса (образование кислоты/газа)	Род бактерий
	подвиж-ность	тип дыхания					

Таблица 4

Культуральные и морфологические признаки колоний микроскопических грибов каждого типа с чашки с агаром Сабуро, таксономическая принадлежность грибов

Микроорганизмы	Тип колонии	Культуральные признаки	Морфологические признаки	% соотношение типов грибов	Род гриба
Дрожжевые грибы					
Плесневые грибы					

Таблица 5

Состав микрофлоры почвы на стекле обрастания

Характер микрофлоры, морфологические признаки колоний	Плотность обрастания	Доминирующие формы микроорганизмов

Выводы о составе микрофлоры почвы, выявленной при применении метода серийных десятикратных разведений и метода стекол обрастания.

Вопросы для самопроверки

1. Расскажите об особенностях отбора пробы почвы на микробиологический анализ.
2. Расскажите об исследовании микрофлоры почвы методом серийных десятикратных разведений.
3. Как исследуют микрофлору почвы методом стекла обрастания? Какую информацию можно получить при применении данного метода?
4. Как рассчитывают общую бактериальную обсемененность почвы?
5. По каким признакам проводится идентификация бактерий?
6. Как провести тесты на выявление у бактерий ферментов цитохромоксидазы и каталазы?
7. Какие признаки бактерий учитываются на рыбо-пептонном желатине (РПЖ)?
8. Как определить подвижность и тип дыхания бактерий на полужидкой среде?
9. Какие признаки бактерий учитываются на среде Гисса с глюкозой?
10. Как идентифицировать плесневые и дрожжевые грибы на агаре Сабуро?

Локальный электронный методический материал

Оксана Владимировна Казимирченко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор И. Голубева

Локальное электронное издание

Уч.-изд. л. 2,4. Печ. л. 2,2.

Издательство федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»
236022, Калининград, Советский проспект, 1