

**БРЯНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ**

**АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**Кафедра химии, биотехнологии и физиологии  
растений**

***МИКРОБИОЛОГИЯ***

учебно-методические указания  
для лабораторно-практических занятий  
направление 110900 - Технология производства и  
переработки сельскохозяйственной продукции

Ф.И.О. студента

\_\_\_\_\_

Группа \_\_\_\_\_

БРЯНСК 2011

УДК

Леонова, Н.В. Учебно - методические указания для лабораторно-практических занятий по курсу «Микробиология» для студентов агроэкологического института обучающихся по направлению 110900 – Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции. Брянск. Издательство Брянской ГСХА, 2011 г. с.60

Рабочая тетрадь предназначена для студентов агроэкологического института. Приведены формы регистрации результатов исследований, задания в тестовой форме, словарь терминов и определений.

РЕЦЕНЗЕНТ: к. с.-х. наук, доцент Мамеева В.Е.

© БГСХА, 2011

© Н.В. Леонова, 2011

## **ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

1. Не разрешается входить в лабораторию в пальто, головном уборе, вносить посторонние вещи.
2. К занятиям допускаются студенты только в халатах.
3. Студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы и другое оборудование.
4. Необходимо ознакомиться с техникой безопасности при работе в микробиологической лаборатории и расписаться в журнале по технике безопасности.
5. Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями, микроскопом, спиртовками.
6. Запрещается работать с неисправными электроприборами. О всех неполадках сообщать преподавателю.
7. В лаборатории необходимо поддерживать порядок и чистоту. По окончании занятий протереть иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, привести в порядок рабочее место.
8. Не оставлять открытыми чашки, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов, чтобы не допускать их распыления, поскольку некоторые микроорганизмы являются аллергенами.

**РАЗДЕЛ 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ  
(СИСТЕМАТИКА И МОРФОЛОГИЯ  
МИКРООРГАНИЗМОВ)**

**Тема 1. Общая характеристика техники  
культивирования микроорганизмов**

*Работа 1.1 Основные положения техники  
культивирования микроорганизмов*

Дать определение основным микробиологическим терминам:

а) культивирование -----  
-----  
-----

культура -----  
-----  
-----

культура чистая -----  
-----  
-----

культура накопительная-----  
-----  
-----

ПОСЕВ -----  
-----  
-----

пересев (пассирование)-----  
-----  
-----

инкубация – -----  
-----  
-----

косая среда (косяк)-----  
-----  
-----

прямой агар (столбик)-----  
-----  
-----

питательная среда- -----  
-----  
-----

физиологическая группа-----  
-----  
-----

б) техника посева:  
метод «штрих»-----  
-----

метод «укола»-----  
-----

в) методы хранения микроорганизмов:  
-----  
-----

-----  
-----  
-----  
-----

г) методы стерилизации:

стерилизация – -----  
-----

методы:-----  
-----  
-----

пастеризация – -----  
-----  
-----

д) питательные среды:

- по значению:  
универсальные-----  
-----  
-----

элективные (избирательные)-----  
-----  
-----

- по составу:  
-----  
-----  
-----  
-----

-ПО КОНСИСТЕНЦИИ:

-----  
-----  
-----

*Работа 1.2. Особенности работы со световым  
микроскопом. Ознакомление с иммерсионной системой  
микроскопа*

Теория вопроса:  
основные технологические характеристики микроскопа:

типы объективов:

сухие -----  
-----

иммерсионные -----  
-----

собственное увеличение объектива -----  
-----  
-----

разрешающая способность объектива -----  
-----  
-----

числовая апертура объектива -----  
-----  
-----  
-----

коэффициент увеличения микроскопа-----  
-----  
-----

полезное увеличение микроскопа-----  
-----  
-----

разрешающая способность микроскопа-----  
-----  
-----

*Работа 1.3. Техника приготовления препаратов  
микроорганизмов*

Техника приготовления препарата «раздавленная капля»:  
-----  
-----  
-----

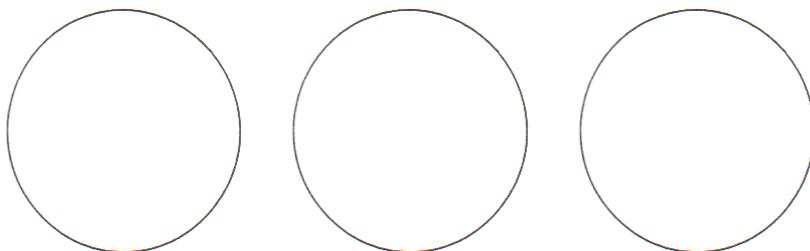
Техника приготовления фиксированного окрашенного  
препарата: -----  
-----  
-----  
-----

методы окраски: -----  
-----  
-----  
-----

типы красителей: -----  
-----  
-----  
-----  
-----

Задание

1) приготовить препараты «раздавленная капля», отобрав микробный материал из накопительных сред (настой сена, настой навоза, культура дрожжей и др.).



---

**Тема 2. Морфология важнейших групп микроорганизмов**

*Работа 2.1. Прокариоты, морфологические типы бактерий. Эукариоты.*

Теория вопроса:

Прокариоты

-----  
-----

---

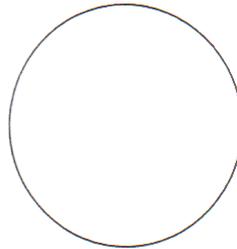
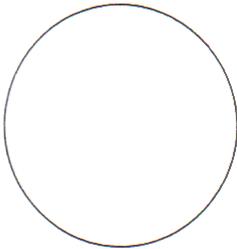
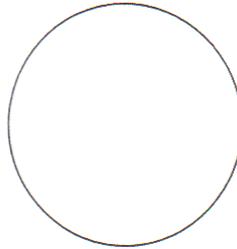
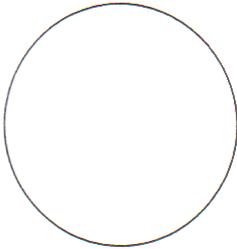
---

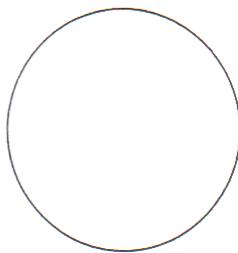
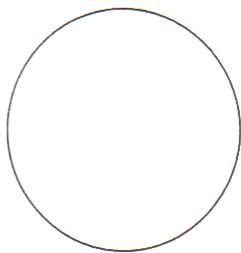
---

Задание

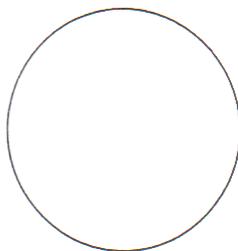
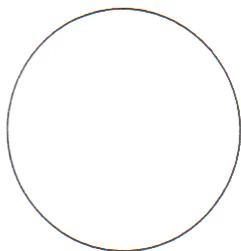
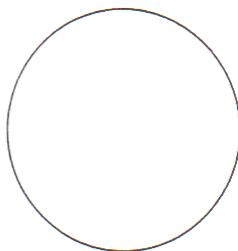
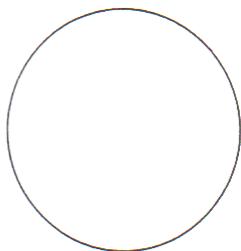
1) приготовить фиксированные окрашенные препараты, микроскопировать и зарисовать шаровидные, палочковидные, извитые формы.

Шаровидные

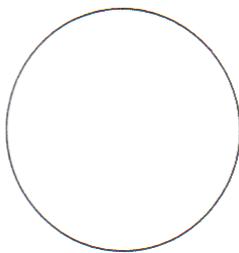
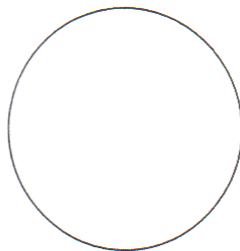
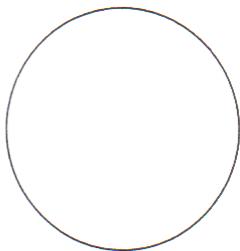




Палочковидные



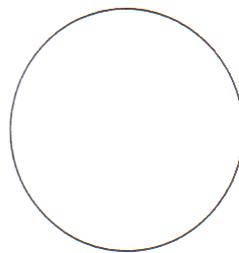
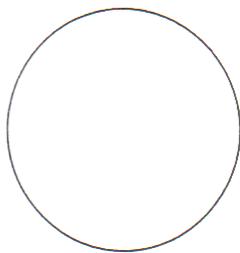
## Извитые



## Актиномицеты

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



## Эукариоты

Теория вопроса:

-----

-----

-----

-----

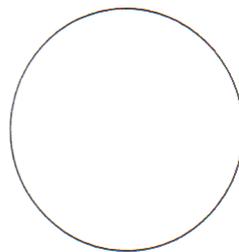
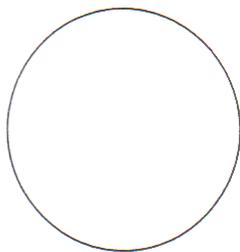
-----

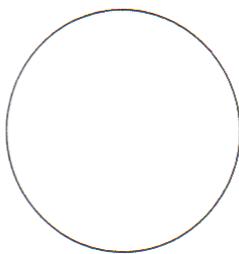
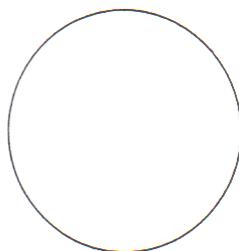
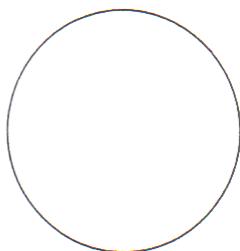
-----

-----

### Задание

2) приготовить препараты - дрожжей, микроскопических грибов, микроскопировать и сделать рисунки.

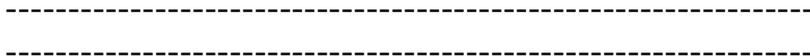




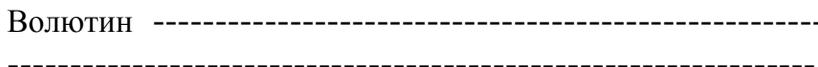
**Тема 3. Цитохимические методы исследования микроорганизмов**

*Работа 3.1 Окраска включений в клетках микроорганизмов*

Теория вопроса:



Методика окраски включений:



-----  
-----  
-----  
-----

Гликоген -----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

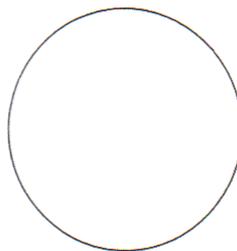
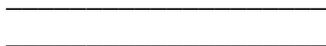
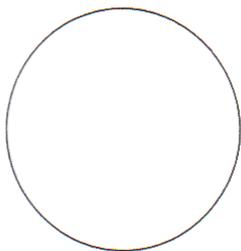
Гранулеза-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

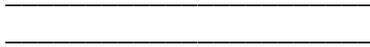
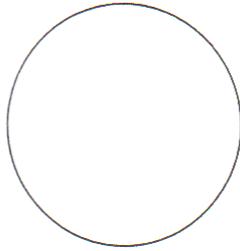
Жир-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

### Задание

- 1) приготовить препараты в раздавленной капле культур микроорганизмов;
- 2) окрасить включения в клетках микроорганизмов: гликоген в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, гранулезу в клетках маслянокислых бактерий *Clostridium butyricum*, жир в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Заполнить таблицу.

Включения	Химическая природа запасного вещества	Реактив на выявление	Условия накопления в клетках
Гранулеза			
Гликоген			
Жир			





*Работа 3.2 Окраска спор у палочковидных бактерий*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

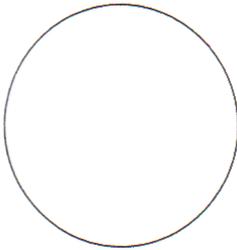
Методика окраски спор у бактерий:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

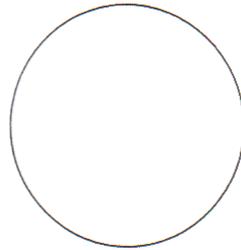
-----  
-----  
-----

Задание

- 1) окрасить споры в клетках *Bacillus mycoides*, *Clostridium butyricum*;
- 2) препараты микроскопировать, сделать рисунки



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**РАЗДЕЛ 1.2. ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
И ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ  
РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТОВ**

**Тема 4. Микробиологический анализ  
микрорганйзмов в различных субстратах**

*Работа 4.1. Микробиологический анализ воздуха*

Теория вопроса:

-----  
-----

---

---

### Задание

- 1) подсчитать общую численность микроорганизмов, количество микроорганизмов в  $1\text{ м}^3$  воздуха.
- 2) описать культурально - морфологические признаки исследуемой колонии. Результаты опыта занести в таблицы.

### Ход работы:

1. Приготовление питательной среды. Для выделения микробов из исследуемого воздуха в культуру готовят универсальную среду – мясопептонный агар (МПА). Готовую среду разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве.

2. Стерилизация посуды. Чашки Петри заворачивают в бумажные пакеты и стерилизуют в сушильном шкафу ( $140-160^{\circ}$ ) в течение 2-3 часов.

3. Приготовление агаровой пластинки. Пробирку со стерильным МПА расплавляют на кипящей водяной бане. Ее содержимое переносят в стерильную чашку Петри соблюдая правила стерильности. После остывания на дне чашки образуется агаровая пластинка, готовая к засеву.

4. Засев агаровой пластинки пластинки осуществляют методом оседания. Для этого достаточно открыть чашку со стерильной агаровой пластинкой и оставить её открытой 5 минут. При этом микробы из воздуха, оседая с пылью, засевают поверхность пластинки. После окончания засева чашку закрывают и переносят в термостат на 5-7 дней. После окончания срока инкубации в чашке обнаруживаются микробные колонии.

5. Учет колоний на агаровой пластинке. Для количественного учета микробного населения воздуха

подсчитывают число колоний, выросших в чашке. Далее рассчитывают микробную загрязненность воздуха. При этом учитывают тот факт, что на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри на площади  $100 \text{ см}^2$  за 5 минут осаждается столько микробных клеток, сколько их приходится на 10 литров воздуха ( $0,01 \text{ м}^3$ ). Зная площадь чашки ( $78,5 \text{ см}^2$ ), можно подсчитать количество клеток в  $1 \text{ м}^3$  воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на  $100 \text{ см}^2$  и далее – в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

#### Количественная характеристика микроорганизмов

Место отбора пробы воздуха	Количество колоний в чашке Петри, шт.	Количество микробных клеток в $1 \text{ м}^3$ воздуха

-----  
 -----  
 -----

Вывод:-----  
 -----  
 -----

Культурально-морфологические признаки колонии

а) размеры колонии (мм) -----

-----

б) форма колонии-----

-----

-----

в) цвет колонии-----

-----

-----

г) профиль колонии-----

-----

-----

д) поверхность колонии-----

-----

-----

е) край колонии-----

-----

ж) консистенция колонии-----

-----

-----

з) форма микробной клетки-----

-----

По совокупности культурально – морфологических признаков исследуемый микроорганизм относится к роду

(виду): -----  
-----

*Работа 4.2 Количественный учет физиологических групп почвенных микробов, выделяемых по способу азотного питания*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----

Ход работы:

1. Приготовление питательных сред. **Среда №1. Мясопептонный агар (МПА)**- применяется для выделения аминокетотрофных микробов. Состав: мясной бульон, пептон, агар. Источником углерода, азота и энергетическим субстратом служат органическим соединения азота (белки, пептиды, аминокислоты). Источником минеральных элементов питания – минеральные соли, содержащиеся в мясном бульоне.

**Среда №2. Среда Чанека** - используется для выделения аминокетотрофных микроорганизмов. Представляет собой водный раствор сахарозы (источник углерода и энергетический субстрат), в который добавляют минеральные соли, содержащие азот и все другие необходимые элементы минерального питания.

**Среда №3. Среда Эшби** - предназначена для культивирования олигонитрофильных микроорганизмов. Представляет собой водный раствор глюкозы (источник углерода и энергетический субстрат) и минеральных солей,

содержащих все необходимые элементы минерального питания, за исключением азота.

2. Стерилизация посуды: чашки Петри, колбы, пипетки заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу. Стерилизация воды: водопроводную воду наливают в колбы, закрывают ватной пробкой и стерилизуют в автоклаве в том же режиме, что и питательные среды.

3. Приготовление микробной суспензии из исследуемой почвы.

Из среднего образца почвы отбирают аналитическую пробу массой 10 г, переносят в колбу с 90 мл стерильной воды. Содержимое колбы перемешивают в течение 5 минут, дают отстояться около минуты, при этом получают суспензию первого разведения, где микробы разведены по сравнению с их концентрацией в почве в 10 раз. Затем проводят второе разведение, для чего пипеткой переносят из первой колбы 10 мл суспензии первого разведения в стерильную колбу с 90 мл стерильной воды и перемешивают; в суспензии второго разведения микробы будут разведены по сравнению с их концентрацией в почве в 100 раз. Аналогично этому проводят третье, четвертое, пятое и шестое разведение. Для засева питательной среды используют суспензии пятого и шестого разведения, где концентрация микробов по сравнению с их исходной концентрацией в почве будет меньше соответственно в 100000 и в 1000000 раз.

4. Засев питательной среды. Готовят агаровую пластику в чашке Петри. Стерильной пипеткой отбирают 1 мл микробной суспензии соответствующего разведения и переносят (соблюдая стерильность) в стерильную чашку Петри. Вращением чашки равномерно распределяют микробную суспензию и оставляют для остывания. Засеянные таким образом чашки Петри инкубируют в

термостате 5-7 дней. После окончания периода инкубации подсчитывают число колоний, выросших в чашке. Количество микробных клеток соответствующей физиологической группы микроорганизмов рассчитывают по формуле:

$$X = n \cdot g, \text{ где}$$

X - число микробных клеток соответствующей физиологической группы в пересчете на 1 г почвы

n – число колоний, выросших в чашке

g – степень разведения микробной суспензии

### Задание

1) подсчитать общую численность микроорганизмов, количество микроорганизмов в 1г почвы. Результаты занести в таблицу.

Питательные среды	Количество микроорганизмов в чашке Петри, шт.	Количество микроорганизмов на 1г почвы
МПА		
Чапек		
Эшби		

-----  
-----  
-----  
-----

Вывод:-----  
-----  
-----

### *Работа 4.3 Получение чистой культуры бактерий*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

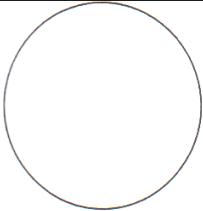
#### Задание

- 1) выделить чистую культуру бактерий из колоний, выросших на МПА в чашках Петри;
- 2) описать характер роста выделенной культуры;
- 3) приготовить фиксированный окрашенный препарат, микроскопировать, результаты опыта занести в таблицу.

#### Ход работы:

Выделенные в чистую культуру микроорганизмы культивируют в лаборатории для их дальнейшего исследования. Готовят агаризированную питательную среду, разливают в пробирки и стерилизуют в автоклаве. Затем пробирки оставляют в вертикальном положении-получают пробирки с прямым агаром (столбик). Стерильной иглой подхватывают небольшое количество микробного материала из колонии, выросшей на поверхности агаровой пластинки, в чашке и переносят в засеваемую пробирку, прокалывая столбик до дна (глубинный посев). Засеянные пробирки инкубируют, после чего описывают характер роста культуры.

## Характеристика выделенной чистой культуры

Описание характера роста культуры на прямом агаре	Морфологические признаки	Предполагаемый род (или группа микроорганизма)
	 <hr data-bbox="406 619 664 625"/>	

### *Работа 4.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам*

Теория вопроса:

-----

-----

-----

-----

-----

-----

-----

-----

-----

#### Задание

- 1) определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам;

- 2) измерить диаметр зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, результаты опыта занести в таблицу.

#### Ход работы

1. В стерильные чашки Петри разливают по 20 мл среды МПА. После того как среда остынет, на агаровую пластинку вносят одну каплю микробной суспензии и растирают ее стерильным шпателем. Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги, пропитанные разными антибиотиками. Засеянные чашки 30 минут выдерживают при комнатной температуре, затем помещают в термостат на 16-18 часов при T 37C.

2. После периода инкубации измеряют диаметр зон. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, больше 10 мм на чувствительность микроорганизмов.

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма	Заключение

Вывод: -----  
-----  
-----

### Задания в тестовой форме:

1. Стерилизация инструментов, питательной среды насыщенным паром под давлением:

а) тиндализация б) пастеризация в) холодная стерилизация г) автоклавирование

2. Прокаливание инструментов в пламени спиртовки:

а) тиндализация б) пастеризация в) фламбирование г) автоклавирование

3. Полное уничтожение клеток микроорганизмов и их спор в различных материалах (средах, посуде и т.д.):

а) стерилизация б) пастеризация в) фламбирование г) автоклавирование

4. Растительный коллоид (полисахарид), получаемый из водорослей:

а) пептон б) триптон в) дрожжевой экстракт г) агар д) желатин

5. Выращивание микроорганизмов на питательных средах – это...

а) культура б) пересев в) инкубация г) культивирование

6. При развитии на твердой питательной среде бактерии образуют:

а) пленку б) культуру в) посев г) суспензию д) колонию

7. При выращивании в жидкой среде бактерии могут образовать:

а) пленку б) культуру в) суспензию г) колонию

8. Культура, содержащая потомство клеток одного вида:

- а) накопительная б) чистая г) естественная

9. Указать последовательно стадии приготовления фиксированного препарата:

- а) промывка б) высушивание в) нанесение
- г) фиксация д) окраска

10. Морфологическому типу тетракокки соответствуют:

а) шаровидные формы, клетки которых после деления в одной и той же плоскости располагаются в виде цепочки

б) шаровидные формы, клетки которых после деления расходятся и располагаются поодиночке

в) шаровидные формы, клетки которых делятся в двух взаимоперпендикулярных плоскостях (сочетание четырех кокков)

г) шаровидные формы, клетки которых после деления не расходятся и располагаются попарно

11. Морфологическому типу сарцины соответствует:

а) шаровидные формы, клетки которых после деления в одной и той же плоскости располагаются в виде цепочки

б) шаровидные формы, клетки которых после деления расходятся и располагаются поодиночке

в) пакетообразные кокки – результат деления в трех взаимоперпендикулярных плоскостях

г) шаровидные формы, клетки которых после деления не расходятся и располагаются попарно

12. Клостридиальный морфологический тип – это...

- а) неспорообразующие палочки

б) спорообразующие палочки, диаметр спор которых превышает ширину клетки (спора чаще всего расположена в центре клетки или смещена к одному из ее краев)

в) спорообразующие палочки, размер спор которых не превышает ширину клетки

г) спорообразующие палочки, размер спор которых превышает ширину клетки (спора расположена на краю клетки)

13. Плектридиальный морфологический тип – это..

а) неспорообразующие палочки

б) спорообразующие палочки, диаметр спор которых превышает ширину клетки (спора чаще всего расположена в центре клетки или смещена к одному из ее краев)

в) спорообразующие палочки, размер спор которых не превышает ширину клетки

г) спорообразующие палочки, размер спор которых превышает ширину клетки (спора расположена на краю клетки)

14. Спириллы - это...

а) извитые формы, клетки которых представляют  $\frac{1}{4}$  часть витка спирали

б) извитые бактерии, имеющие форму спирали (4-6 витков)

в) извитые бактерии, имеющие форму спирали (6-15 и более витков)

15. Вибрионы - это...

а) извитые формы, клетки которых представляют  $\frac{1}{4}$  часть витка спирали

б) извитые бактерии, имеющие форму спирали (4-6 витков)

в) извитые бактерии, имеющие форму спирали (6-15 и более витков)

# РАЗДЕЛ 1.3. ТРАНСФОРМАЦИЯ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

## Тема 5. Участие микроорганизмов в процессах брожения

### *Работа 5.1 Спиртовое брожение*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

#### Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение спиртового брожения;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественные реакции;
- 4) приготовить прижизненный препарат, микроскопировать;
- 5) зарисовать форму дрожжей, дать характеристику возбудителю брожения.

#### Ход работы

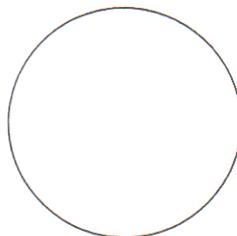
1. Получения накопительной культуры. Готовят жидкую питательную среду (в раствор сахарозы добавляют минеральные соли, содержащие необходимые микробам элементы минерального питания (N, P, K и т.д.)). Среду наливают в колбу толстым слоем (для создания

анаэробных условий), вносят небольшое количество микробной массы дрожжей и инкубируют в термостате 2-3 дня – при этом питательная среда превращается в накопительную культуру.

2. Обнаружение продуктов жизнедеятельности. Этиловый спирт в культуральной жидкости обнаруживают путем качественной реакции с иодом. Для проведения реакции к 4-5 мл культуральной жидкости добавляют несколько кристалликов металлического иода, перемешивают и нагревают до полного растворения иода. При наличии спирта обнаруживается характерный запах йодоформа.

3. Обнаружение возбудителей спиртового брожения. Готовя препарат «раздавленная капля» и микроскопируют. На препарате обнаруживаются овальные или шаровидные одноклеточные клетки дрожжевого гриба.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Работа 5.2 Молочнокислое брожение

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

### Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение молочнокислого брожения;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественные реакции;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать.
- 5) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю брожения.

### Ход работы:

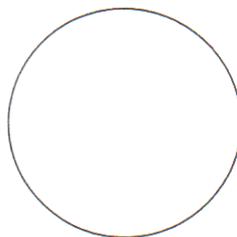
1. Получение накопительной культуры. Мелко измельченную капусту солят, укладывают в банку и утрамбовывают для создания анаэробных условий. Полученная питательная среда содержит все необходимые микробам питательные вещества. Засевать среду не следует, так как на листьях капусты имеются в изобилии микробные клетки возбудителя. Среду помещают в термостат на 3-7 дней. После инкубации среда становится накопительной культурой.

2. Обнаружение продуктов жизнедеятельности бактерий. К 1-2 мл сока прибавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 0,5 мл насыщенного

раствора сульфата меди. Смесь перемешивают, нагревают 5 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения к раствору добавляют несколько капель 0,2% раствора тиофена. При наличии молочной кислоты развивается вишнево-красное окрашивание раствора.

3. Обнаружение возбудителя в культуре. Каплю культуры переносят на предметное стекло, готовят мазок и микроскопируют на большом увеличении микроскопа. На препарате обнаруживаются молочнокислые бактерии.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### *Работа 5.3 Маслянокислое брожение*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

## Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение маслянокислого брожения;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественные реакции;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат, микроскопировать;
- 5) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю брожения.

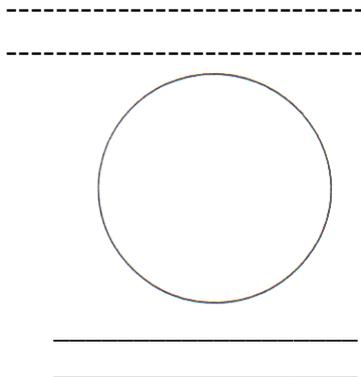
### Ход работы:

1. Получение накопительной культуры. Готовят питательную среду (мелко измельченный неочищенный картофель помещают в колбу и заливают толстым слоем воды (для создания анаэробных условий). В колбу добавляют немного мела, после чего пастеризуют при  $80^{\circ}\text{C}$  10-15 минут. При этом вегетативные клетки микробов погибают, но остаются живыми споры маслянокислых бактерий, которые в изобилии имеются на кожуре картофеля. Колбы инкубируют в термостате 5-7 дней, после чего накопительная культура готова.

2. Обнаружение продуктов жизнедеятельности. Масляную кислоту обнаруживают в культуре цветной реакцией с хлорным железом. К 4-5 мл культуры добавляют 1-2 мл 5% хлорного железа, перемешивают и нагревают до кипения. При наличии масляной кислоты развивается красно-коричневая окраска раствора.

3. Обнаружение возбудителей маслянокислого брожения в культуре. Каплю культуры (из придонных слоев) переносят на предметное стекло и готовят мазок, микроскопируют с иммерсией. На препарате обнаруживают маслянокислые бактерии.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



### *Работа 5.4 Брожение целлюлозы (клетчатки)*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

#### Задание

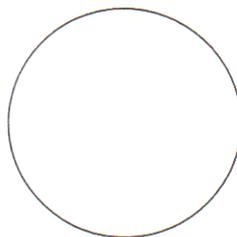
- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение брожения целлюлозы;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать.
- 5) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю брожения.

### Ход работы:

1. Получение накопительной культуры. Готовят питательную среду. В круглую плоскодонную колбу вносят 1-2 г нарезанной узкими полосками фильтровальную бумагу и заливают доверху средой. Среду заражают почвой. Колбу закрывают пробкой с отверстием для выхода газов и помещают в термостат на 2-3 недели при  $T$  30-35 С. По мере брожения бумага ослизняется, желтеет и разрушается.

2. Обнаружение возбудителей брожения в культуре. Из придонных слоев культуры пинцетом извлекают кусочек разложившейся бумаги и переносят на предметное стекло, готовят мазок, микроскопируют с иммерсией. На препарате обнаруживают целлюлозоразрушающие бактерии.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Заполнить таблицу для закрепления знаний, полученных в результате изучения основных процессов брожения и окисления органических соединений микроорганизмов

Виды процесса	Возбудители процесса	Отличительные особенности возбудителей	Исходные продукты	Конечные продукты	Условия, благоприятствующие процессу	Значение для природы и человека
Спиртовое брожение						
Молочнокислое гомоферментативное						
Гетероферментативное						
Бифидо брожение						



## РАЗДЕЛ 1.4. УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ КРУГОВОРОТА АЗОТА

### Тема 6. Микроорганизмы в круговороте азота

#### *Работа 6.1 Аммонификация (минерализация) азотсодержащих органических соединений*

Теория вопроса

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

#### Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение аммонификации;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественную реакцию;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 5) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю процесса.

Ход работы:

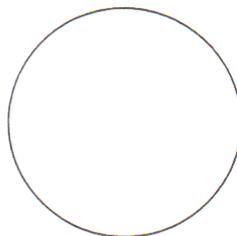
1. Получение накопительной культуры. Мясной бульон с добавлением пептона засевают небольшим количеством почвы. Засеянную среду инкубируют в термостате 3-5 дней.

2. Обнаружение аммиака в культуральной среде. К 2-3 мл среды добавляют несколько капель реактива Несслера.

При наличии аммиака развивается желто-коричневая окраска.

3. Обнаружение возбудителей в культуральной среде. Каплю культуры переносят на предметное стекло, размазывают, готовят мазок. Полученный препарат микроскопируют с иммерсионным маслом. На препарате обнаруживают аммонифицирующие бактерии.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



-----  
-----

### *Работа 6.2 Процесс нитрификации*

#### Теория вопроса

-----  
-----  
-----  
-----

#### Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса нитрификации, записать уравнения 1 и 2 фаз;

- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественные реакции (результаты занести в таблицу);
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 5) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю процесса

#### Ход работы:

1. Получение накопительной культуры. Готовят питательную минеральную среду, состоящую из раствора солей. В качестве энергетического материала в среду вводят соли аммония (при культивировании возбудителей первой фазы нитрификации) или соли азотистой кислоты (при культивировании возбудителей второй фазы нитрификации). Среду засевают комочком почвы и инкубируют в термостате 2-3 недели.

2. Обнаружение продуктов жизнедеятельности. Для обнаружения нитритов к трем каплям реактива на нитриты (цинк-иод-крахмал) добавляют одну каплю концентрированной 20%  $H_2SO_4$  и одну каплю исследуемой культуры. При наличии нитритов развивается желто-синяя окраска.

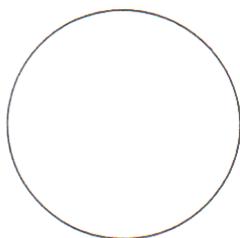
Для обнаружения нитратов к реактиву на нитраты (кристаллический дифениламин) добавляют каплю исследуемой культуры и каплю концентрированной  $H_2SO_4$ . При наличии нитратов развивается темно-синяя окраска раствора.

3. Обнаружение возбудителей процесса. Петлей подхватывают каплю культуры и переносят на предметное стекло, готовят мазок, микроскопируют с иммерсией. На препарате обнаруживают нитрифицирующие бактерии.

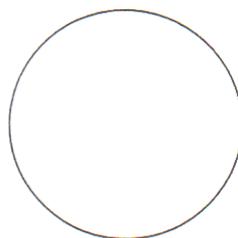
Исходные продукты процесса	Используемые реактивы	Окрашивание (цвет)
Аммиак		
Нитриты		
Нитраты		

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## *Работа 6.3 Азотфиксация свободноживущими бактериями*

Теория вопроса:

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

### Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 3) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю процесса

### Ход работы:

1. Получение накопительной культуры. Готовят жидкую питательную среду, растворяя в воде минеральные соли, за исключением азота. В качестве источника углерода и энергетического субстрата в среду вводят растворимые сахара (глюкозу, сахарозу). Среду засевают небольшим количеством почвы и инкубируют в термостате 5-7 дней. При этом на поверхности среды образуется бурая пленка культуры азотобактера, а в придонных слоях – взвесь культуры клостридиума.

2. Обнаружение свободноживущих азотфиксаторов в культуре. Петлей отбирают каплю с поверхностного слоя культуры (для обнаружения бактерий рода *Azotobacter*), а пипеткой – каплю из придонных слоев культуры (для обнаружения бактерий рода *Clostridium*). Готовят фиксированные окрашенные препараты, микроскопируют с иммерсией.

---

---

---

---

---

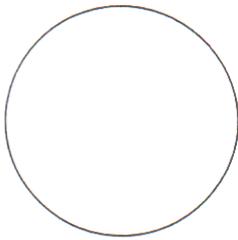
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

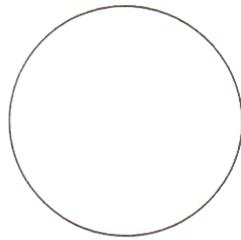
---

---

---

---

---



---

---

*Работа 6.4 Азотфиксация симбиотическими бактериями*

**Теория вопроса**

---

---

---

---

-----  
-----

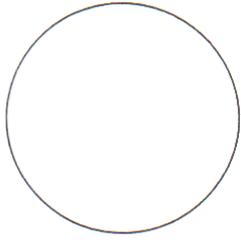
Задание

- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 3) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю процесса

Ход работы:

Для исследования клубеньковых бактерий берут развитый клубенёк с корня бобовых растений (люпин, бобы и др.) и выдавливают его содержимое на предметное стекло. Готовят мазок, микроскопируют с иммерсией. На препарате обнаруживают клубеньковые бактерии в форме палочек и бактериоидов

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



-----  
-----

Заполнить таблицу для закрепления знаний, полученных в результате изучения процессов, связанных с превращениями микроорганизмами соединений азота

Виды процесса	Возбудители процесса	Отличительные особенности возбудителей	Исходные продукты	Конечные продукты	Условия, благоприятствующие процессу	Значение для природы и человека
Аммонификация (минерализация)						
Нитрификация I фаза II фаза						
Денитрификация						
Азотфиксация						

## Задания в тестовой форме

1. Брожение – это...

- а) расщепление органических веществ в анаэробных условиях
- б) окисление глюкозы
- в) синтез АТФ
- г) превращение глюкозы в гликоген

2. Процесс аэробного дыхания отображает схема:

- а)  $2\text{HNO}_3 + 12\text{H} = \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}$
- б)  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 = 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 + 38 \text{ АТФ}$
- в)  $\text{H}_2\text{SO}_4 + 8\text{H} = \text{H}_2\text{S}$

3. Процесс анаэробного дыхания отображает схема:

- а)  $2\text{HNO}_3 + 12\text{H} = \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}$
- б)  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 = 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 + 38 \text{ АТФ}$
- в)  $\text{H}_2\text{SO}_4 + 8\text{H} = \text{H}_2\text{S}$

4. Фотосинтез способны осуществлять:

- а) цианобактерии
- б) бациллы
- в) пурпурные бактерии
- г) зеленые бактерии

1. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют спиртовое брожение: а) *Streptococcus lactis* б) *Saccharomyces cerevisiae* в) *Lactobacillus brevis* г) *Acetobacter aceti* д) *Schizosaccharomyces pompe*

2. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют маслянокислое брожение: а) *Streptococcus lactis* б) *Saccharomyces cerevisiae* в) *Lactobacillus brevis* г) *Clostridium butiricum* д) *Clostridium pasteurianum*

3. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют окисление спирта до уксусной кислоты: а) *Saccharomyces cerevisiae* б) *Acetobacter aceti*

- в) *Lactobacillus brevis* г) *Clostridium butiricum*  
д) *Gluconobacter oxydans*

4. Выбрать микроорганизмы, участвующие в процессе нитрификации 1 фазы: а) *Nitrosospira bria*  
б) *Pseudomonas fluorescens* в) *Nitrobacter winogradskii*  
г) *Nitrosomonas europea* д) *Bacillus mycoides*

5. Выбрать микроорганизмы, участвующие в процессе нитрификации 2 фазы: а) *Nitrosospira bria* б) *Pseudomonas fluorescens* в) *Nitrobacter winogradskii* г) *Nitrosomonas europea* д) *Bacillus mycoides* е) *Nitrobacter agilis*

6. Выбрать микроорганизмы, участвующие в процессах азотфиксации (свободноживущие микроорганизмы в анаэробных условиях): а) *Pseudomonas fluorescens* б) *Clostridium pasteurianum* в) *Nitrobacter agilis* г) *Clostridium butiricum*

7. Фермент микроорганизмов, участвующий в процессах азотфиксации: а) нитратредуктаза  
б) нитрогеназа в) уреазы г) оксидаза

8. Выбрать микроорганизмы, участвующие в процессах аммонификации белка в аэробных условиях: а) *Bacillus mycoides* б) *Pseudomonas stutzeri* в) *Bacillus subtilis* г) *Proteus vulgaris*

9. Клетки клубеньковых бактерий, перешедшие в цитоплазму растительных клеток, растут, делятся, а затем формируют особые образования...

- а) инфекционные нити б) бактериоиды  
в) леггемоглобин г) вакуоли



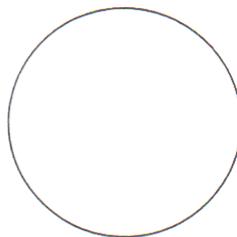
### Задание

- 1) провести органолептическую оценку качества силоса (цвет, запах, консистенция);
- 2) провести исследование качественного состава микрофлоры силоса;
- 3) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 4) зарисовать формы доминирующих микроорганизмов, дать характеристику;
- 5) определить общую кислотность силоса, заполнить таблицу.

### Ход работы:

1. Из образца силоса выбирают сочный кусочек и плотно прижимают его к предметному стеклу. Полученный отпечаток сушат, готовят мазок и микроскопируют с иммерсией. На препарате обнаруживают молочнокислые бактерии. Дают характеристику обнаруженным микробным клеткам.

-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Из среднего образца силоса отбирают аналитическую пробу массой 20 г, переносят её в колбу, добавляют 200 мл воды, нагревают в течение 1 часа, остужают и фильтруют.

10 мл фильтрата переносят в стаканчик с двойным количеством дистиллированной воды, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,1н раствором гидроксида натрия до появления розовой окраски.

Расчет кислотности силоса ведут по формуле

$$X = \frac{\alpha \cdot \vartheta \cdot 0.009 \cdot 100}{\eta \cdot \rho}$$

X - содержание молочной кислоты в силосе, %;

$\alpha$  - количество щелочи, пошедшее на титрование, мл;

$\eta$  - объем фильтрата, взятого для титрования, мл;

$\vartheta$  - общий объем экстракта, мл;

$\rho$  - масса навески силоса, г;

0,009 - количество граммов молочной кислоты, эквивалентное 1мл 0,1Н раствора гидроксида натрия;

100 - коэффициент для пересчета граммов молочной кислоты в проценты

-----

-----

-----

-----

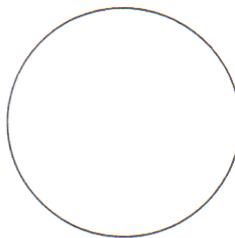
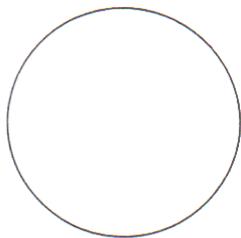
Микроорганизмы	Значение pH			
	7,0	6,0	5,0	4,0
молочнокислые				
гнилостные				
маслянокислые				
микроскопические грибы				



поверхностного слоя, то на препарате можно обнаружить единичные палочки и кокки.

Среди гнилостных микроорганизмов на препарате можно обнаружить микрококки, кишечную палочку, споровые формы. Из аэробов обнаруживают бациллы, из анаэробов – клостридии.

-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----
-----	-----



---

---

---

---

Вывод: -----

-----

-----

## Словарь терминов и определений

**Автотрофы** – микроорганизмы, способные синтезировать органические вещества из неорганических, используя энергию солнца (фототрофы) или энергию химических реакций (хемотрофы).

**Азотфиксаторы** – бактерии и водоросли, способные фиксировать газообразный азот из воздуха.

**Аммонификация** – разложение, гниение белков с образованием аммиака.

**Анабиоз** – состояние живых организмов, при котором происходит резкое торможение метаболизма и всех форм активности в экстремальных условиях существования.

**Анаэробное дыхание** – энергетический процесс окисления микроорганизмами органических веществ в анаэробных условиях, при этом окислителем служит не свободный кислород, а нитраты, нитриты и сульфаты.

**Анаэробы** – организмы, способные жить в среде без кислорода. Получают необходимый для жизни кислород посредством расщепления кислородосодержащих органических соединений.

**Антагонизм** – отрицательное взаимодействие между разными видами, расами, штаммами микроорганизмов.

**Аэробное дыхание** – биохимическое окисление органических веществ в присутствии и за счет молекулярного кислорода.

**Аэробы** – микроорганизмы, способные жить только в среде, содержащей свободный кислород.

**Бактерия** – микроскопический, обычно одноклеточный микроорганизм, обладающий клеточной стенкой, но не имеющий оформленного ядра.

**Бактероид** – бактерии, проникающие в корни (бобовых) растений, достигающие в них крупных размеров и участвующие в фиксации атмосферного азота.

**Бацилла**- бактерия, имеющая форму палочки.

**Вибрионы** – бактерии, имеющие форму коротких, изогнутых в виде запятой палочек.

**Вирус** – неклеточная форма жизни, представляющая собой крайне упрощенную паразитическую структуру, способную проникать в живую клетку и размножаться внутри нее.

**Гетеротроф** – организм, использующий в качестве источника энергии и питательных веществ материалы органического происхождения, произведенные другими видами.

**Денитрификация** – разрушение группой почвенных и водных бактерий солей азотной кислоты (нитратов) до нитритов, молекулярного азота и аммиака, что приводит к обеднению почвы.

**Жизненный цикл особи** – совокупность явлений и процессов, составляющих круговорот в течении известного промежутка времени жизни одной особи.

**Инкубация** – выращивание микроорганизмов при определенной температуре.

**Клубеньковые бактерии** – аэробные бактерии, формирующие на корнях бобовых растений клубеньки и фиксирующие азот воздуха в условиях тесного симбиоза с высшими растениями.

**Косая среда** (косяк) – среда застывшая при наклонном положении для получения скошенной поверхности агара.

**Круговорот азота** – биогеохимический процесс в биосфере, в котором участвуют организмы-редуценты, а также нитрифицирующие и клубеньковые бактерии.

**Культивирование** – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

**Культура** – развивающиеся на питательной среде микроорганизмы.

**Культура накопительная** – состоит преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов.

**Культура чистая** – содержит потомство клетки только одного вида.

**Микробиология** – биологическая дисциплина, изучающая систематику, морфологию, физиологию, биохимию микроорганизмов.

**Микроорганизм** – мельчайший, преимущественно одноклеточный организм, видимый только в микроскоп. Микроорганизмами являются: бактерии, микоплазмы, микроскопические грибы, вирусы, риккетсии, водоросли, простейшие.

**Нитриты** – промежуточный продукт окисления аммиака или восстановление нитратов. Присутствие нитритов указывает на существование нестойкого органического вещества преимущественно животного происхождения.

**Нитрификация** – процесс превращения азотсодержащих веществ в форму, пригодную для усвоения высшими растениями: аммиак – нитриты-нитраты.

**Нитрифицирующие бактерии** – хемосинтезирующие бактерии, окисляющие аммиак, который образуется при гниении органических остатков, до азотной кислоты, затем в ходе реакции с минеральными веществами почвы превращается в усвояемые растениями соли азотной кислоты.

**Нуклеоид** - бактериальное «ядро» оптически недифференцирующие частицы в полости бактериальной клетки. Содержит ДНК и несет наследственную информацию.

**Пассирование (пересев)** – перенесение выращенных клеток микробов из одной среды в другую (стерильную).

**Посев** – внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры.

**Прокариоты** – древнейшие организмы. Не обладают четко оформленным ядром с оболочкой и типичным хромосомным аппаратом. Наследственная информация передается и реализуется через ДНК.

**Прямой агар (столбик)** – плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки.

**Стерилизация или обеспложивание** - это полное уничтожение клеток микроорганизмов в питательных средах, посуде и пр.

**Факультативный анаэроб** – способный жить как в среде без кислорода, так и в присутствии свободного кислорода.

**Фиксация** – обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру.

**Эпифиты** – организмы, живущие на поверхности наземных органов растений, но не питающиеся ими, не являющиеся их паразитами.

**Эукариоты** – высшие организмы, четко оформленные ядра которых обладают оболочкой, отделяющей их от цитоплазмы.

Учебное издание

НАТАЛЬЯ ВИТАЛЬЕВНА ЛЕОНОВА

Учебно-методические указания для лабораторно –  
практических занятий по курсу «Микробиология», для  
студентов агроэкологического института,  
обучающихся по направлению 110900 - Технология  
производства и переработки сельскохозяйственной  
продукции. Классификация (степень) выпускника –  
бакалавр