

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФГБОУ ВПО «БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра химии, биотехнологии и физиологии растений

Милехина Н.В.

МИКРОБИОЛОГИЯ

учебно-методические указания
для лабораторно-практических занятий по
направлению 110400.62 и 35.03.04 - Агрономия

Ф.И.О. студента

Группа _____

Брянская область
2015

УДК 579 (076)

ББК 28.4

М 60

Милехина Н.В. Микробиология: Учебно - методические указания/ Н.В. Милехина.- Брянск: Издательство Брянский ГАУ, 2015. - 63 с.

Учебно - методические указания для лабораторно-практических занятий по курсу «Микробиология» разработаны в соответствии с примерной программой разработанной УМО по агрономическому образованию при ФГОУ ВПО Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева.

Указания предназначены для студентов агроэкологического института обучающихся по программе подготовки бакалавров по направлению 110400. 62 и 35.03.04. Приведены формы регистрации результатов исследований, задания в тестовой форме, словарь терминов и определений. Брянск. Издательство Брянского ГАУ, 2015 г. с.64

РЕЦЕНЗЕНТ: к. с.-х. наук, доцент Симонов В. Ю.

Рекомендовано к изданию решением методической комиссии агроэкологического института от 26 марта 2015 года.

© Брянский ГАУ, 2015

© Н.В. Милехина, 2015

Цель дисциплины – формирование знаний по основам общей и сельскохозяйственной микробиологии и умений использования полученных знаний для решения практических задач сельскохозяйственного производства.

Задачи:

- изучить систематику, морфологию, генетику и размножение бактерий; метаболизм микроорганизмов, участие микроорганизмов в превращениях различных соединений;

- изучить почвенные микроорганизмы и освоить методы определения их состава и активности;

- сформировать понятия о роли микроорганизмов в почвообразовательном процессе и воспроизводстве плодородия почв, микробиологических процессах при получении органических удобрений; о влиянии агротехнических приемов на почвенные микроорганизмы; о возможности использования микроорганизмов в технологиях сельскохозяйственного производства.

Место дисциплины в структуре ООП

Дисциплина входит в базовую часть профессионального цикла.

Предшествующими дисциплинами, на которых непосредственно базируется «Микробиология», являются школьный курс биологии, ботаника, органическая и неорганическая химия, почвоведение.

Дисциплина «Микробиология» является основополагающим для изучения последующих дисциплин: земледелие, агрохимия, физиология и биохимия растений, растениеводство.

Требования к результатам освоения дисциплины (профессиональные компетенции):

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих **профессиональных компетенций (ПК)**:

готовность использовать микробиологические технологии в практике производства и переработки сельскохозяйственной продукции (ПК-4);

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать: историю и задачи микробиологии, систематику, морфологию, генетику и размножение бактерий; взаимоотношения микроорганизмов и окружающей среды; взаимоотношения микроорганизмов между собой и с другими существами; метаболизм микроорганизмов, участие микроорганизмов в превращениях соединений углерода, азота, фосфора, серы, железа и других элементов; почвенные микроорганизмы и методы определения их состава и активности; роль почвенных микроорганизмов в формировании и воспроизводстве плодородия почвы; о влиянии технологических приемов на деятельность микроорганизмов в почве; о синтетических химических соединениях и их детоксикации микроорганизмами; эпифитных микроорганизмах растений; о биопрепаратах сельскохозяйственного назначения; микробиологии кормов;

уметь: приготовить препараты микроорганизмов, различать основные формы бактерий, получать накопительные и чистые культуры микроорганизмов;

владеть: методами приготовления препаратов и микроскопирования, методами культивирования микроорганизмов; навыками проведения количественного учета микроорганизмов в различных субстратах и качественных реакций на продукты метаболизма микроорганизмов.

Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

а) основная литература

1. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология, Дрофа, 2008. С. 444
2. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для бакалавров, М.: Издательство Юрайт, 2014. с. 445
3. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии, Дрофа, 2004. с. 464

б) дополнительная литература

1. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология, изд-во МГУ, 2010
2. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв, изд-во МГУ, 2005.-445 с.
3. Современная микробиология. Прокариоты. /под ред. Ленгелера И., Древса Г., Шлегеля Г. М. Мир, 2005, т. 1, 2 1120 с.
4. Шлегель Э.Г. История микробиологии. М. УРСС, 2005. -304 с.
5. Кротов Д.Г, Мамеева В.Е., Симонов В.Ю. Биология с основами экологии. Брянская ГСХА, 2009

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. 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»:

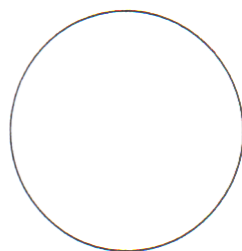
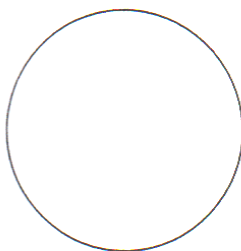
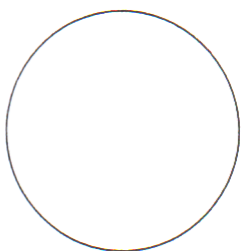
Техника приготовления фиксированного окрашенного препарата: -----

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.

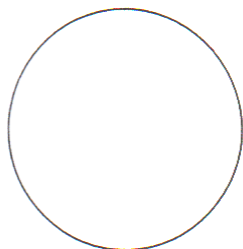
Теория вопроса:

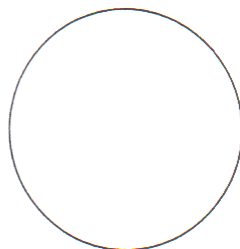
Прокариоты

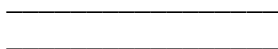
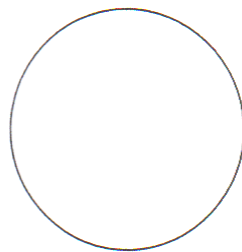
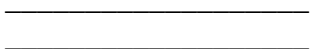
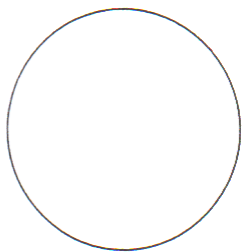
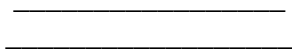
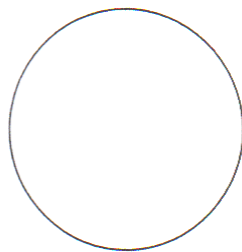
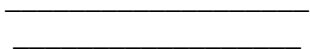
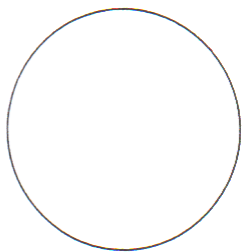
Задание

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

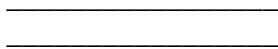
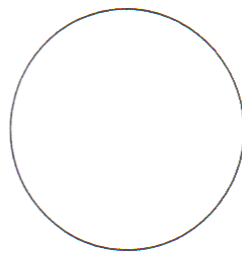
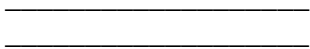
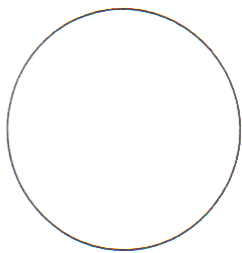
Шаровидные

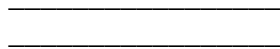
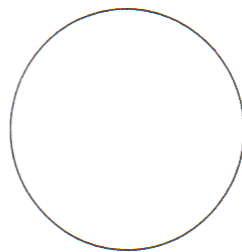
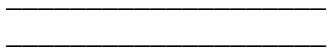
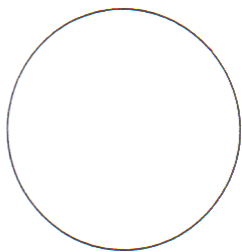




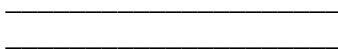
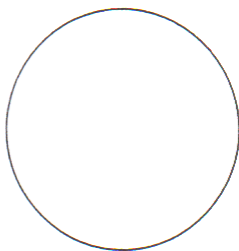
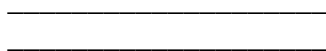
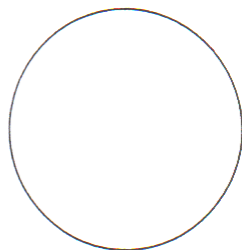
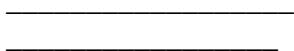
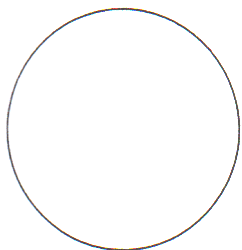


Палочковидные



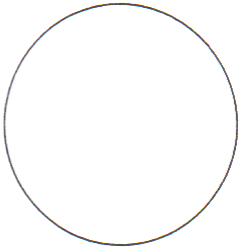


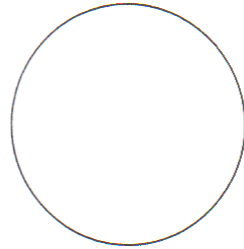
Извитые



Актиномицеты

Теория вопроса:



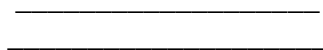
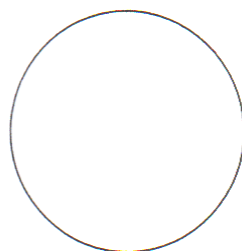
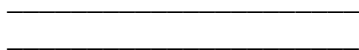
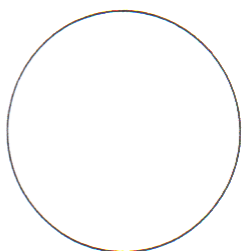
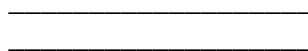
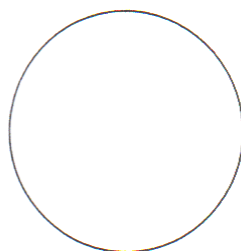
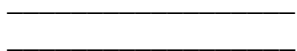
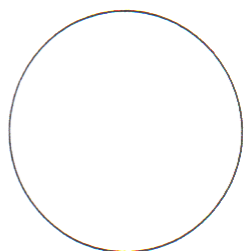
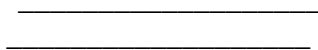
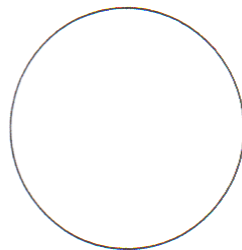
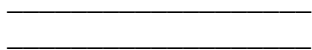
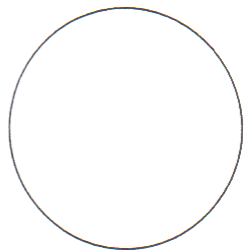


Эукариоты

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:

Волютин -----

Гликоген -----

Гранулеза-----

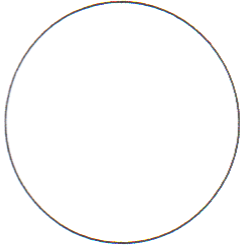
Жир-----

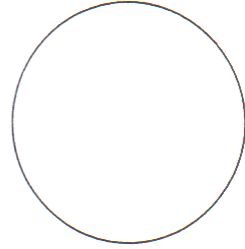
Задание

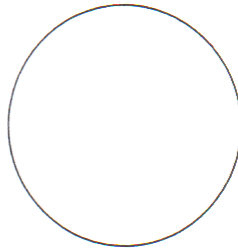
1) приготовить препараты в раздавленной капле культур микроорганизмов;

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			







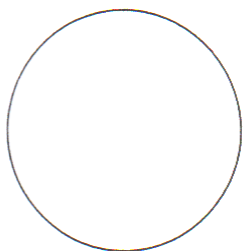
Работа 3.2 Окраска спор у палочковидных бактерий

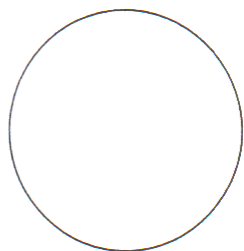
Теория вопроса:

Методика окраски спор у бактерий:

Задание

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





ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Тема 4. Микробиологический анализ микроорганизмов в различных субстратах

Работа 4.1. Микробиологический анализ воздуха

Теория вопроса:

Задание 1.

- 1) подсчитать общую численность микроорганизмов, количество микроорганизмов в 1м^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 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 осуществляют методом оседания, открывая чашку на 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. Учитывают тот факт, что на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри на площади 100 см^2 за 5 минут осажается 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 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 см^2 и далее – в 1 м^3 воздуха.

Количественная характеристика микроорганизмов

Место отбора пробы воздуха	Количество колоний в чашке Петри, шт.	Количество микробных клеток в 1 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 Получение чистой культуры бактерий

Теория вопроса:

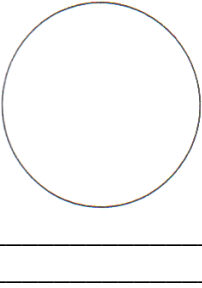
Задание

- 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 прямой агар (столбик). Для засева стерильной иглой подхватывают небольшое количество микробного материала из колонии, выросшей на агаровой пластинки, 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)
		

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)

ПРЕВРАЩЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ УГЛЕРОДА 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.

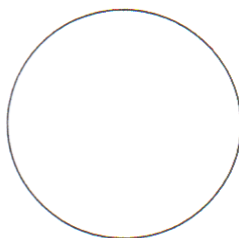
Ход работы

1. Получения накопительной культуры.

Готовят жидкую питательную среду (в раствор сахара-зы 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.

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 его растворения. 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 Молочнокислородное брожение

Теория вопроса:

Задание

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

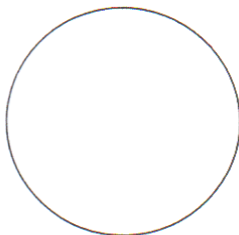
Ход работы

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 препарате обнаруживаются молочно-кислые 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.

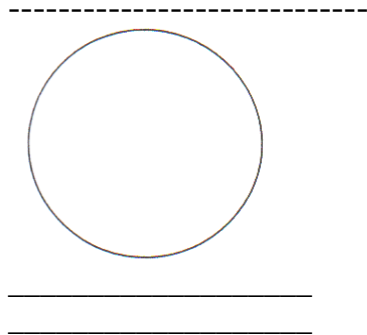
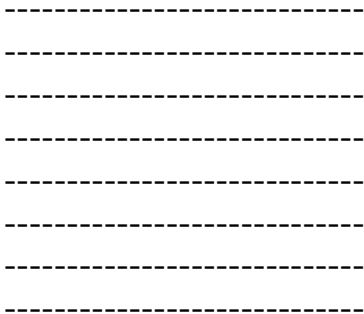
Готовят питательную среду (мелко измельченный неочищенный картофель помещают в колбу и заливают толстым слоем воды (для создания анаэробных условий). В колбу добавляют немного мела, после чего пастеризуют при 80°C 10-15 минут. При этом вегетативные клетки микробов погибают, но остаются живыми споры маслянокислых бактерий, которые в изобилии имеются на коже 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, микрофотографируют 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.

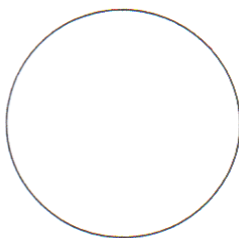
Ход работы

1. Получение накопительной культуры.

Готовят питательную среду. В круглую плоскодонную колбу вносят 1-2 г нарезанной узкими полосками фильтровальную бумагу и заливают доверху средой и вносят почву. 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 целлюлозорозрушающие 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 приrody и человека
Спиртовое брожение						
Молочно-кислое го-моферментативное						
Гетероферментативное						
Бифидо брожение						
Масляно-кислое						

Ацетонобу- тиловое							
Брожение целлюлозы (клетчатки)							
Брожение пектиновых веществ							
Окисление целлюлозы (клетчатки)							
Окисление жира							
Окисление углеводоро- дов							

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА

Тема 6. Микроорганизмы в круговороте азота

Работа 6.1 Аммонификация (минерализация) азотсодержащих органических соединений

Теория вопроса

Задание

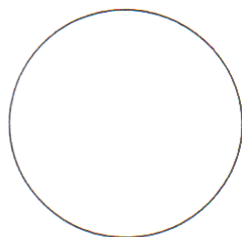
- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) химизм процесса, записать уравнение аммонификации;
- 3) определить продукт жизнедеятельности микроорганизмов, провести качественную реакцию;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 5) зарисовать форму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

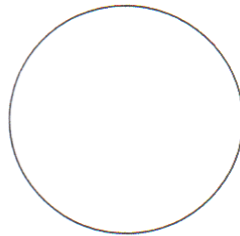
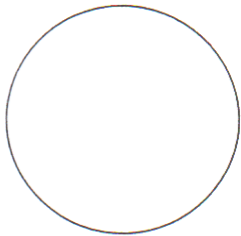
Готовят питательную минеральную среду, состоящую из раствора солей. В качестве энергетического материала в среду вводят соли аммония (при культивировании возбудителей I фазы нитрификации) или соли азотистой кислоты (при культивировании возбудителей II фазы нитрификации). Среду засевают почвой и инкубируют в термостате 2-3 недели.

2. Обнаружение продуктов жизнедеятельности. Для обнаружения нитритов к 3 каплям реактива на нитриты (цинк-иод-крахмал) добавляют 1 каплю 20% (к) H_2SO_4 и 1 каплю исследуемой культуры. При наличии нитритов развивается желто-синяя окраска.

Для обнаружения нитратов к реактиву (кристаллический дифениламин) добавляют 1 каплю исследуемой культуры и 1 каплю (к) H_2SO_4 . При наличии нитратов развивается темно-синяя окраска раствора.

3. Обнаружение возбудителей процесса. 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

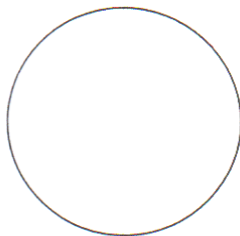
- 1) изучить получение накопительной культуры;
- 2) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 3) зарисовать форму бактерий, дать характеристику возбудителю процесса

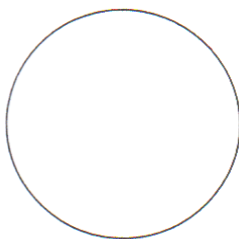
Ход работы

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 клостридия.

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

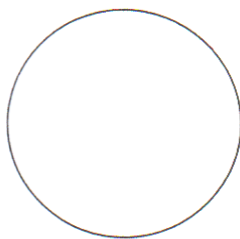
Теория вопроса

Задание

- 1) приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов, микроскопировать;
- 2) 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						
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
5. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют спиртовое брожение:
 - а) *Streptococcus lactis*
 - б) *Saccharomyces cerevisiae*
 - в) *Lactobacillus brevis*
 - г) *Acetobacter aceti*
 - д) *Schizosaccharomyces pompe*
6. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют маслянокислое брожение:
 - а) *Streptococcus lactis*
 - б) *Saccharomyces cerevisiae*
 - в) *Lactobacillus brevis*
 - г) *Clostridium butiricum*
 - д) *Clostridium pasteurianum*
7. Указать виды микроорганизмов, которые осуществляют окисление спирта до уксусной кислоты:

- а) *Saccharomyces cerevisiae* б) *Acetobacter aceti*
в) *Lactobacillus brevis* г) *Clostridium butyricum*
д) *Gluconobacter oxydans*

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

9. 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*

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

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

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

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

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

Раздел 2. ПОЧВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Тема 7. Почвенные микроорганизмы

Работа 7.1 Количественный учет физиологических групп почвенных микробов, выделяемых по способу азотного питания

Теория вопроса:

Ход работы:

1. Приготовление питательных сред.

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 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 Эшби - предназначена для культивирования олигонитрофильных микроорганизмов. Представляет со-

бой 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:

$$X = n \cdot r,$$

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

n – число колоний, выросших в чашке

r – степень разведения микробной суспензии

Задание

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

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

Вывод:-----

Тема 8. Эпифитная микрофлора зерна при хранении урожая

Работа 8.1 Микробиологический анализ зерна

Теория вопроса:

Задание

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

Ход работы:

1. Готовят и стерилизуют универсальную среду МПА.

2. Чашки Петри, колбы, пипетки заворачивают в бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу. Водопроводную воду наливают в колбы, закрывают ватными пробками и стерилизуют.

3. Готовят микробную суспензию из эпифитной микрофлоры зерна. Для этого 5 г исследуемого зерна пере-

носят в колбу с 50 мл стерильной воды. Добавляют 2-3 г стерильного кварцевого песка и перемешивают круговыми движениями в течение 5 мин. При этом получают суспензию первого разведения (кратность разведения-1:10). Затем 5 мл отстоявшейся суспензии первого разведения переносят в колбу с 45 мл стерильной воды, перемешивают; при этом получают суспензию второго разведения (кратность разведения - 1:100). Аналогично этому получают суспензии третьего и четвертого разведения.

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 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:

$$X = a \cdot v,$$

где X - число микробных клеток соответствующей физиологической группы в пересчете на 1 г зерна;

a – число колоний, выросших в чашке;

v – степень разведения микробной суспензии

Питательная среда	Количество микроорганизмов в чашке Петри, шт.	Количество микробных клеток на 1г зерна
МПА		

Вывод: -----

Тема 9. Микробиология кормов

Работа 9.1 Микробиологический анализ силоса

Теория вопроса

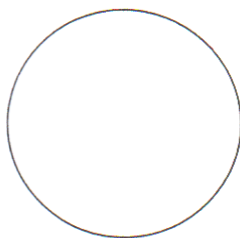
Задание

- 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 течении 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, %;

α - количество щелочи, пошедшее на титрование, мл;

η - объем фильтрата, взятого для титрования, мл;

ϑ - общий объем экстракта, мл;

ρ - масса навески силоса, г;

0,009 - количество граммов молочной кислоты, эквивалентное 1мл 0,1 н 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				

Тема 10. Микробиологический анализ бактериальных препаратов

Работа 9.1 Определение числа клеток азотобактера в азотобактерине

Теория вопроса

Задание

- 1) провести исследование бактериального препарата азотобактерина;
- 2) посчитать количество колоний, выросших в чашке и число клеток азотобактера в препарате;
- 3) определить численность посторонней микрофлоры в азотобактерине;
- 4) приготовить фиксированный окрашенный препарат, микроскопировать;
- 5) зарисовать формы обнаруженных микроорганизмов, дать характеристику

Ход работы:

10 г препарата помещают в колбу со 100 мл воды, выдерживают в течение 1 часа периодически встряхивая. 10 мл полученной бактериальной суспензии переносят в колбу с 90 мл стерильной воды – получают 2-е разведение. Готовят последующие разведения до 10^{-8} . Стерильной пипеткой отбирают 1 мл микробной суспензии из последнего разведения и переносят (соблюдая стерильность) в сте-

рильную чашку Петри, заливают 7-10 мл расплавленной и охлажденной до T 45C средой Эшби и перемешивают. Засеянные чашки Петри инкубируют в термостате 3-4 дня.

Общее количество клеток подсчитывают по формуле:

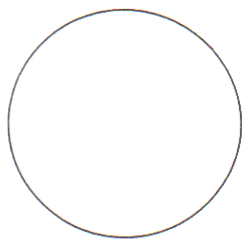
$$X = K * P,$$

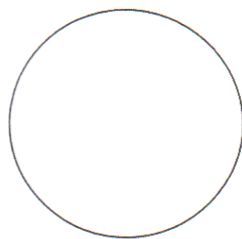
где K – среднее количество колоний;

P- степень разведения

В 1 г препарата при выпуске должно быть не менее 100 млн клеток.

Постороннюю микрофлору определяют путем микроскопирования и посевом суспензии на среду МПА. Подсчет колоний проводят на 3 сутки.





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 надземных 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 МИЛЕХИНА

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно - методические указания
для лабораторно-практических занятий
по курсу «Микробиология»

РЕДАКТОР ПАВЛЮТИНА И.П.

Подписано к печати 19.06.2015 г. Бумага печатная

Усл. п.л. 3,72. Тираж 50. Изд. номер 3027.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365, Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, БГАУ

