

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

КАФЕДРА «БИОТЕХНОЛОГИЯ, ЖИВОТНОВОДСТВО И ХИМИЯ

ПРАКТИКУМ

по дисциплине

МИКРОБИОЛОГИЯ

Казань 2024

УДК 579.2
ББК 28.4

Составители: Сибгатуллова А.К., Даминова А.И., Шайдуллин Р.Р., Тюлькин С.В.

Рассмотрены и одобрена:

1. Решением кафедры «Биотехнология, животноводство и химия» (протокол № 10 от 27.05.2024 г.).
2. Решением методической комиссии Института Агробиотехнологий и землепользования Казанского ГАУ (протокол № 9 от 06.05.2024 г.).

Рецензенты:

Профессор кафедры «Микробиология, вирусология и иммунология» в Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, доктор ветеринарных наук А.К. Галиуллин

Доцент кафедры «Микробиология и биотехнология» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н. И. Вавилова, кандидат биологических наук Иващенко С.В.

Микробиология: практикум А.К. Сибгатуллова, А.И. Даминова, Р.Р. Шайдуллин, С.В. Тюлькин. – Казань: КГАУ, 2024. – 68 с.

Практикум предназначен для лабораторных занятий и самостоятельной работы студентов по дисциплине «Микробиология», обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» и 19.03.01 «Биотехнология» (уровень бакалавриата).

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	4
Лабораторная работа № 1	4
Лабораторная работа № 2	11
Лабораторная работа № 3	16
Лабораторная работа № 4	21
Лабораторная работа № 5	25
Лабораторная работа № 6	27
Лабораторная работа № 7	30
Лабораторная работа № 8	35
РАЗДЕЛ 2. МИКРОБИОЛОГИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ	38
Лабораторная работа № 9	38
Лабораторная работа № 10	41
Лабораторная работа № 11	50
Лабораторная работа № 12	60
Лабораторная работа № 13	65

РАЗДЕЛ 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Тема 1. Знакомство с микробиологической лабораторией

Цель занятия: ознакомление с устройством микробиологических лабораторий, изучение правил работы в них. Овладеть методикой приготовления препаратов для микроскопии и их окраски простым методом. Ознакомиться с основными формами бактерий.

Материалы и оборудование. Оборудование, входящее в перечень бактериологических лабораторий. Комплект микроскопов. Готовые микроскопические материалы различных форм бактерий.

Цель микробиологических исследований - установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного и на объектах окружающей среды. Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий - изучение микроорганизмов. Задачи микробиологических исследований - идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале, определить их видовую принадлежность.

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения ряда правил техники безопасности и поведения. Техника выполнения лабораторных работ связана с использованием открытого огня горелок или спиртовок, представляющих прямую опасность для работающего и окружающих. Необходимость работы в области пламени горелок, в свою очередь, связана с соблюдением правил асептики для обеспечения стерильности и во избежание засорения культур микроорганизмов микробами из окружающей среды. Кроме того, при выделении из объектов окружающей среды могут быть обнаружены условно патогенные микроорганизмы, грибы, споры которых обладают аллергенностью.

1.1. Правила техники безопасности при работе в микробиологических лабораториях

1. Работа в лаборатории ведется исключительно в халатах и сменной обуви или бахилах.
2. Верхняя одежда и сумки не должны находиться в лаборатории.
3. Запрещается принимать пищу и пить воду в лаборатории.
4. Работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом.
5. При случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности дезинфицирующим раствором.

6. После работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств.

7. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и лишними вещами.

8. Студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

9. К выполнению каждой лабораторной работы нужно приступать только после получения инструктажа по технике безопасности, ознакомления с методиками и разрешения преподавателя.

10. Лабораторную работу необходимо проводить в точном соответствии с описанием в методических указаниях.

11. Для проведения работы пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реактивов нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость.

12. Если в ходе опыта требуется нагревание, надо следовать предусмотренным методическими указаниями способам нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на спиртовке.

13. Нагревание предметного стекла в пламени спиртовки при приготовлении некоторых препаратов следует проводить равномерно.

14. Запрещается работать с неисправными электроприборами. О любых неисправностях следует незамедлительно информировать преподавателя.

15. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Задание 1. Заполните таблицу «Помещения микробиологической лаборатории» (Таблица. 1). В таблице обязательно укажите все помещения располагающиеся в микробиологической лаборатории.

Задание 2. Прочитайте и запомните правила работы в микробиологической лаборатории.

Задание 3. Просмотрите схему микробиологической лаборатории (рис.1). На рисунке обозначены разными цветами «чистая» и «заразная» («грязная») зоны лаборатории. Подумайте почему их так называют? Запишите в тетрадь определения «чистая» и «заразная» зона.

Таблица 1

«Помещения микробиологической лаборатории»

№ п/п	«Чистая зона»	«Заразная зона»
1.	Гардероб	Тамбур
2.

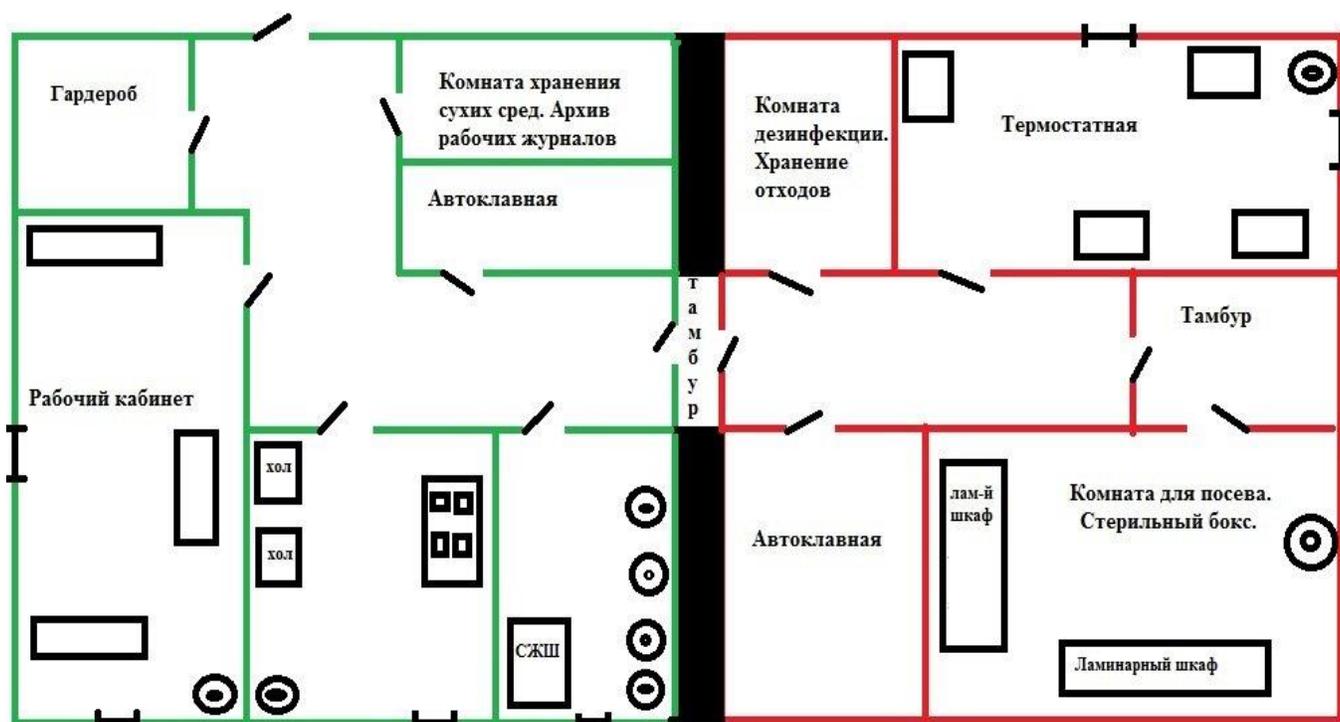


Рисунок 1. Схема микробиологической лаборатории.

“Чистая зона” - это
“Грязная зона” - это

1.2. Ознакомиться с основным оборудованием микробиологической лаборатории, с лабораторной посудой, оборудованием рабочего места

Микробиологическая лаборатория должна иметь лабораторные столы, покрытые материалами (линолеум, пластик), которые хорошо моются и могут подвергаться обработке дезинфицирующими растворами; винтовые табуреты, удобные как для микроскопирования, так и для другой работы; шкафы для посуды, питательных сред, реактивов и т.д. Необходимым оборудованием микробиологической лаборатории являются: микроскоп, термостат, автоклав, сушильный шкаф, микроанаэроостат, компрессор, холодильники, центрифуги, весы лабораторные, весы аналитические и т.д.

Лаборатория оснащается необходимой посудой и инструментарием: пробирки бактериологические, серологические и центрифужные, чашки Петри, пипетки градуированные и пастеровские, стекла предметные и покровные, спиртовки, бактериологическая петля, штативы для пробирок, колбы, и т.д.

Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими сыворотками и другими и лабораторными материалами.

Для окраски препаратов на столе должны находиться набор красителей, спирт, фильтровальная бумага, эмалированный кювет, емкость с водой, предметные стекла, пинцет для извлечения стекол, банка для отработанных стекол.

Задание 4. Заполните таблицу 1, укажите основное оборудование рабочего места, микробиологическое оборудование лаборатории и лабораторной посуды. Укажите для чего предназначено лабораторное оборудование, посуда.

Таблица 1

Микробиологическое оснащение лабораторий

№ п/п	Микробиологическое оборудование	Предназначение
1.		
2.		
	Микробиологическая посуда	Предназначение
4		
5.		

Контрольные вопросы

1. Правила работы в микробиологических лабораториях
2. Что означают “чистая и грязная зоны”?
3. Перечислите оборудования имеющееся в микробиологической лаборатории

Тема 2. Освоение техники приготовления препаратов для микроскопии

Цель занятия: освоить технику приготовления препаратов для микроскопии.

Препараты для микроскопии готовят на предметных стеклах. Для работы необходимо иметь специально приготовленные предметные и покровные стекла, которые должны быть чистыми и обезжиренными.

Новые стекла моют в теплой воде с мылом. Для обезжиривания их помещают на 2-3 дня в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира в сосуде с притертой пробкой). Если предметные или покровные стекла были в употреблении, их обрабатывают хромовой смесью, промывают водой, кипятят 30-40 мин в 5%-ном растворе соды. Необработанные стекла можно обезжирить, натерев их мылом, а затем почистить сухой тканью. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно. На недостаточно обезжиренном стекле вода распадается на мелкие капли.

В зависимости от характера исследуемого материала при его взятии используют бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку. Петлю делают

из платиновой или нихромовой проволоки длиной 5-6 см и закрепляют в петледержателе. На конце проволоки делают петлю. Петлю держат, как карандаш. Рабочую часть петли стерилизуют в пламени горелки в вертикальном положении, сначала конец петли, затем петледержатель.

Приготовление окрашенного препарата (мазка) состоит из нескольких этапов (рис. 1): 1) приготовление; 2) высушивание; 3) фиксация; 4) окраска.

1. Приготовление мазка. На предметном стекле с обратной стороны восковым карандашом обозначают место мазка диаметром 2-3 см.

Из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, стерильной петлей берут каплю материала и распределяют на предметном стекле.

Из культур, выращенных на плотной среде, петлей с поверхности берут небольшое количество материала, размешивают в заранее нанесенной на предметное стекло капле физиологического раствора или воды и размазывают по стеклу.

Из плотного патологического материала (печень, почки, селезенка и др.) делают мазки-отпечатки. Для этого стерильными ножницами отрезают кусочек органа и прикладывают к предметному стеклу, делая один или несколько отпечатков.

2. Высушивание мазка. Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате.

3. Фиксация мазка. Мазки фиксируют после полного высыхания с целью:

- 1) закрепить мазок на стекле;
- 2) убить бактерии;
- 3) убитые бактерии лучше воспринимают краску.

Фиксацию мазков осуществляют одним из двух способов: физическим и химическим. Физический метод заключается в трехкратном проведении обратной стороной мазка через пламя спиртовой горелки, задерживая в пламени на 1-2 секунды. При химическом способе мазок погружают в жидкости:

- а) этиловый спирт 96°-ный на 10-15 минут, или
- б) смесь равных объемов спирта и эфира на 10-15 мин, или
- в) ацетон - 5 минут.

4. Окраска мазка. Бактерии различно относятся к красителям, эти свойства называют тинкториальными.

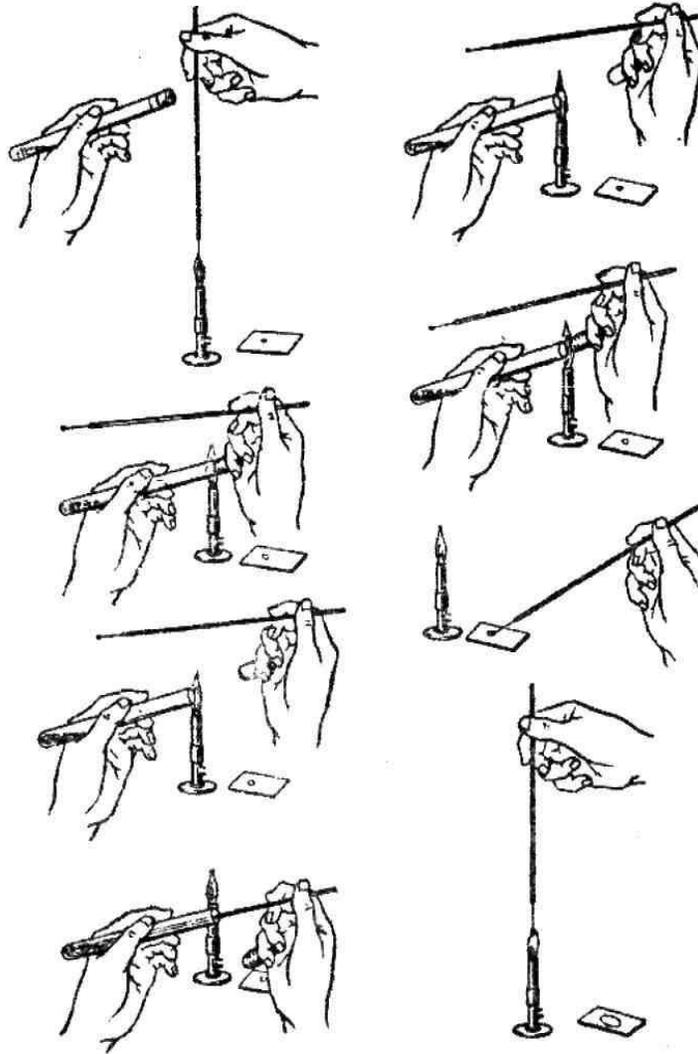


Рисунок 2. Схема приготовления препарата-мазка.

2.1. Микроскопировать нативные препараты бактерий

При микроскопировании живых микроорганизмов можно, наряду с формой бактерий, наблюдать за их подвижностью, а также определить количество клеток в исследуемом объеме. Живые микроорганизмы исследуют в препаратах "висячая" и "раздавленная" капля.

На середину покровного стекла нанести каплю исследуемой жидкой культуры. Каплей вниз опустить покровное стекло на предметное стекло с углублением (лункой), края которого смазаны вазелином. Капля должна свободно свисать и не касаться дна краев углубления. Создается герметически закрытая камера, в которой бактерии можно наблюдать длительное время (4-6 часов). При малом увеличении найти край капли, после чего переместить ее в центр поля зрения и микроскопировать с объективом сильного увеличения и с иммерсионным объективом.

2.2. Приготовление препарата «висячая капля»

На середину покровного стекла нанести каплю исследуемой жидкой культуры. Каплей вниз опустить покровное стекло на предметное стекло с углублением (лункой), края которого смазаны вазелином. Капля должна свободно свисать и не касаться дна краев углубления. Создается герметически закрытая камера, в которой бактерии можно наблюдать длительное время (4-6 часов). При малом увеличении найти край капли, после чего переместить ее в центр поля зрения и микроскопировать с объективом сильного увеличения и с иммерсионным объективом.

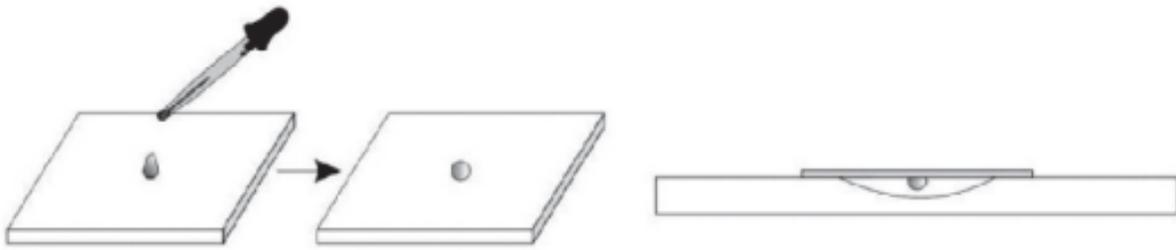


Рисунок 3. Приготовление препарата «висячая капля».

2.3. Приготовление препарата «раздавленная капля»

На середину предметного стекла нанести каплю жидкой бактериальной культуры. Осторожно накрыть её покровным стеклом, чтобы не было пузырьков воздуха, после чего микроскопировать с малым сухим, а затем с большим сухим и иммерсионным объективами.

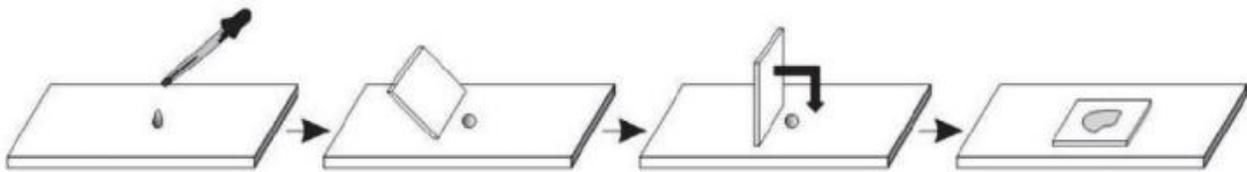


Рисунок 4. Приготовление препарата «раздавленная капля».

2.4. Прижизненная окраска бактерий

Для такой окраски применяются сильно разбавленные растворы красителей, которые не оказывают токсического действия на бактерии. На предметное стекло нанести каплю 0,001% раствора метиленового синего, в которую внести взвесь бактерий, после чего приготовить препарат "раздавленная капля" и микроскопировать его.

Задание 1. Напишите название типа препарата, предназначенного для изучения живых клеток микробов _____

Задание 2. Как называются стекла, которые используются для приготовления препаратов? _____

Задание 3. Напишите последовательные этапы просматривания под микроскопом препарата “раздавленная капля”:

1.	_____
2.	_____
3.	_____
4.	_____
5.	_____
6.	_____

Контрольные вопросы

1. Как проводят микроскопирование нативных препаратов бактерий
2. В чем состоит приготовление препарата "висячая капля"?
3. Как готовится препарат "раздавленная капля"?
4. В чем состоит прижизненная окраска бактерий?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

Тема 1. Спиртовое брожение и количественное определение продуктов жизнедеятельности дрожжей

Цель занятия: изучить спиртовое брожение и количественное определение продуктов жизнедеятельности дрожжей.

Спиртовое брожение – процесс превращения сахара в этиловый спирт и углекислый газ микроорганизмами. $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 27 \text{ ккал}$

Этиловый спирт - один из широко распространенных продуктов сбраживания сахаров микроорганизмами. Даже растения и грибы в анаэробных условиях накапливают этиловый спирт.

Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи, которые выращивают в аэробных условиях, подбирая соответствующие расы, обладающие необходимыми свойствами для данного производства. Процесс спиртового брожения осуществляется с тем же запасом энергии в форме АТФ и тем же ферментативным путем, что и гликолиз, вплоть до образования пировиноградной кислоты. Превращение пировиноградной кислоты в этиловый спирт происходит в два этапа.

Сначала пируват (пировиноградная кислота) декарбоксилируется пируватдекарбоксилазой при участии тиаминпирофосфата до ацетальдегида, а затем ацетальдегид восстанавливается алкогольдегидрогеназой в этанол при участии NADH₂.

При этом дрожжи получают энергию для развития биохимических процессов в клетке: глюкоза - этиловый спирт + CO₂ + 166 кДж/моль.

С энергетической точки зрения брожение - процесс малоэффективный.

Так, если при окислении 1 граммолекулы глюкозы до CO_2 и H_2O в процессе аэробного дыхания синтезируется 36 моль АТФ, то в процессе спиртового брожения - всего 2 моль АТФ. Дрожжи могут переключать один тип обмена веществ (аэробный) на другой (анаэробный).

Наряду с основными продуктами брожения - этиловым спиртом и CO_2 - образуются побочные продукты: глицерин, уксусный альдегид, уксусная кислота, янтарная кислота, а также так называемые сивушные масла.

1.1. Обнаружение продуктов спиртового брожения

Цель занятия: выявить продукты спиртового брожения.

Реактивы и оборудование: живые дрожжи, 20%-й раствор глюкозы, 10%-й раствор йода в растворе йодистого калия, ступка, мерный цилиндр, пестик, пробирка, жидкостный манометр, стакан с теплой водой.

Ход работы: берут 2 г дрожжей и растирают в ступке, приливая постепенно небольшими порциями 10 мл 20% раствора глюкозы. Полученную массу переносят в пробирку, закрывают ее пробкой со вставленной в нее стеклянной трубочкой, с помощью которой пробирку присоединяют к жидкостному манометру.

Пробирку помещают в стакан с водой, температура которой поддерживается $35-40^\circ\text{C}$ и следят за уровнем жидкости в манометре. Для обнаружения, образовавшегося при спиртовом брожении этилового спирта, небольшое количество жидкости из пробирки отфильтровывают и к фильтрату добавляют по каплям 10% раствор йода в растворе йодистого калия.

Вывод: после проведенного исследования сделайте вывод о продуктах спиртового брожения по изменению уровня жидкости в манометре. Напишите общее уравнение реакции спиртового брожения. Какие изменения происходят при добавлении 10% раствор йода в растворе йодистого калия к реакционной массе?

1.2. Использование неорганического фосфата в процессе спиртового брожения

Цель занятия: проведение лабораторной работы с использованием неорганического фосфата в процессе спиртового брожения.

В процессе спиртового брожения все время потребляется неорганический фосфат и количество его в среде постепенно уменьшается. Поэтому, если в пробе, взятой до начала брожения и в трех последующих пробах, взятых в разное время от начала брожения, проделать молибденовую реакцию на фосфорную кислоту, то оказывается, что интенсивность образующейся синей окраски убывает от первой пробы к последней.

Реактивы и оборудование: 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), живые дрожжи, глюкоза кристаллическая, дистиллированная вода, 2,5%-й раствора молибдата аммония в серной кислоте, 0,5%-й раствор аскорбиновой

кислоты, водяная баня, высокий стаканчик, нагретая до 37-38°C, складчатые фильтры, пробирки, мерные цилиндры, стеклянные воронки, колбы, градуированные пипетки.

Ход работы: заготовьте 4 пронумерованные пробирки и налейте в каждую по 3 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В фарфоровой ступке растирают 3 г дрожжей с 3 г глюкозы и 15мл дистиллированной воды. 3 мл смеси переносят в первую пробирку с ТХУ, которая осаждает белки и ферменты и тем самым прекращает брожение.

Оставшуюся смесь переносят в высокий стаканчик и помещают в водяную баню при температуре 37-38°C на 1,5 часа. Через каждые полчаса (т.е. через 0,5 часа, через 1 час и через 1,5 часа от начала брожения) отбирают из стаканчика по 3 мл бродящей смеси и переносят в заготовленные пробирки с ТХУ.

Спустя пять минут после взятия последней пробы содержимое пробирок фильтруют через складчатый фильтр в 4 пронумерованные колбочки – получают безбелковые фильтраты.

В 4 чистые пронумерованные пробирки отливают из каждой колбочки по 0,5 мл безбелкового фильтрата и проводят молибденовую реакцию на фосфорную кислоту.

Для этого в каждую пробирку добавляют по 1 мл 2,5% раствора молибдата аммония в серной кислоте и по 0,5 мл 0,5% раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10-15 минут. По истечении указанного срока делают выводы об интенсивности окраски

Таблица 2.

Определение интенсивности окраски пробирок

Номера пробирок и время взятия проб	№ 1 сразу	№ 2 через 30 мин	№ 3 через 1 час	№ 4 через 1,5 часа
Интенсивность окраски				

Вывод: заполните таблицу 2, сформулируйте вывод на основе анализа результатов опыта.

1.3. Выявление включений и спор в клетках микроорганизмов

Цель занятия: освоить различные методы выявления спор, включений и окраску зерен.

Существуют позитивный и негативный способы окраски препаратов. При позитивном способе микроорганизмов, окрашивая их. При негативном контрастировании краситель заполняет пространство, окружающее клетки, в результате чего микроорганизмы выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном поле.

Различают простые, сложные и дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов. При простой окраске чаще используют один краситель, который прокрашивает всю клетку. Это дает возможность четко определить формы и размеры клеток.

Сложное окрашивание предусматривает применение двух или нескольких красителей, например, диагностическое определение прокариотических микроорганизмов к окраске по Граму.

1.4. Методы выявления включений

В цитоплазме имеются различные включения в виде гранул гликогена, полисахаридов, бета-оксимасляной кислоты и полифосфатов (волютин).

Они накапливаются при избытке питательных веществ в окружающей среде и выполняют роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей. Включения различны по своей химической природе.

Это могут быть жироподобные вещества, полисахариды (гликоген, крахмал, гранулеза), серополифосфаты (волютин), кристаллы щавелевой кислоты и другие. Клеточные включения могут выявляться цитохимическими методами.

1.5. Полифосфаты

1.5.1. Выявление полифосфатов методом Омелянского

1. Приготовит мазок, высушить и зафиксировать его на пламени спиртовки;
2. Окрасить карболовым фуксином Циля в течение 30-60 секунд;
3. Краску смыть, препарат промыть водой и обесцветить 1 % раствором серной кислоты в течение 20-30 секунд;
4. Смыть кислоту, промыть препарат водой;
5. Дополнительно окрасить препарат метиленовым синим (разведенным в соотношении 1:40) в течение одной минуты;
6. Препарат промыть водой, высушить и микроскопировать с помощью иммерсионной системы. При правильном окрашивании зерна волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы.

1.5.2. Окраска зерен волютина по методу Нейссера

1. На фиксированный мазок наносят ацетат синьки Нейссера на 2-3 мин.
2. Наносят раствор Люголя на 10-20 с.
3. Промывают препарат водой.
4. Мазок докрашивают водным раствором везувина или хризоидина в течение 30-60 с.
5. Промывают водой, высушивают, микроскопируют. Зерна волютина представляют собой соединения, имеющие, в отличие от цитоплазмы, щелочную реакцию и поэтому избирательно воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в

темно-синий цвет. Цитоплазма клетки, обладающая кислой реакцией, воспринимает елочной краситель везувин и окрашивается в желтый цвет.

1.5.3. Методы выявления спор

Дифференциальные способы окраски спор основаны на том, что первоначально специальным красителем с подогреванием красят одновременно клетку и спору, затем протоплазму обесцвечивают, оставляя спору окрашенной. После этого протоплазму красят дополнительно в другой контрастный цвет.

1.5.4. Окрашивание спор по методу Пешкова

1. Приготовленный тонкий мазок 2—3-суточной культуры бактерий фиксируют на пламени горелки или смесью 5 частей 40 %-ного формалина и 95 частей 96 %-ного этанола в течение 15 мин.

2. После фиксации мазок заливают метиленовым синим по Лёффлеру и доводят до кипения, держа предметное стекло над пламенем горелки. Продолжительность окрашивания - 10-20 с. По мере испарения добавляют новые порции краски.

3. Препарат тщательно промывают водой и в течение 30 секунд.

4. Препарат докрасивают 0,5 %-ым водным раствором нейтрального красного.

5. Вновь промывают водой, высушивают на воздухе или промокают воду фильтровальной бумагой.

6. Микроскопируют с иммерсией. Микроскопическая картина: споры - голубые или синие, цитоплазма вегетативных клеток - розовая или красная.

1.5.5. Окраска спор по методу Ожешки

1. На нефиксированный препарат наносят 0,5 %-ный раствор хлористоводородной кислоты и подогревают на пламени горелки в течение 2-3 мин. 2. Кислоту сливают, препарат промывают водой, просушивают и фиксируют в пламени горелки.

Задание 1. Напишите в тетради два сложных дифференциальных метода окрашивания препаратов.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение спиртовому брожению и запишите химическую реакцию.
2. Какие микроорганизмы являются возбудителями спиртового брожения и в каких условиях?
3. Расскажите в какие два этапа происходит превращение пировиноградной кислоты в этиловый спирт.
4. Сущность методов по выявлению включений микроорганизмов?
5. Сущность методов по выявлению спор микроорганизмов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ВОДЫ И ВОЗДУХА

Тема 1. Метод определения общих колиформных бактерий в сточных водах

Цель занятия: выделить микроорганизмы (ОКБ) из сточной воды и провести посев на питательной среде.

Общие колиформные бактерии (ОКБ) - грамотрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 - 48 ч. Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) входят в число общих колиформных бактерий, обладают всеми их признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты и газа при температуре $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Материалы и оборудование: стерильные пробирки с резиновыми пробками, чашки Петри со средой Эндо, стерильный физраствор, стеклянные пипетки с грушей, шпатель (стеклянный или пластмассовый), термостат.

Объект исследования: сточная вода.

Ход работы: перед посевом сточной воды в пробирки разливают по 9 мл физраствора с соблюдением правил стерильности. Затем в первую пробирку с 9 мл раствора вносят 1 мл анализируемой воды.

Новой стерильной пипеткой из первой пробирки переносят 1 мл содержимого во вторую пробирку. Из второй пробирки отбирают 1 мл раствора и вносят в следующую пробирку и т.д. Таким образом готовят ряд десятикратных разведений пробы сточной воды (Рис. 5).

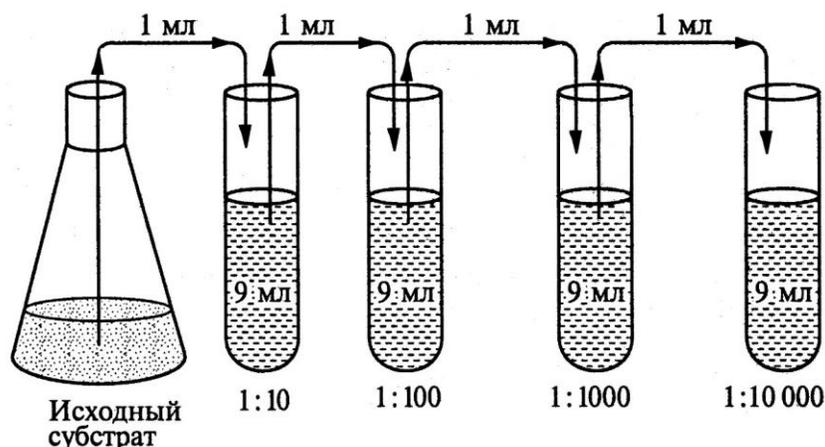


Рисунок 5. Десятикратное разведение сточной воды.

Далее из каждого выбранного разведения делают посев параллельно чашки Эндо, вносят по 0,5 мл в чашку (Рис.6). При посеве 0,5 мл внесенный объем распределяют по всей поверхности чашки покачиванием или стеклянным

шпателем, после чего подсушивают чашку со средой, приоткрывают чашку Петри в термостате и оставляют на 1-2 минуты. Далее чашки закрывают (Рис.7) и переворачивают вверх дном и ставят в термостат, посевы инкубируют 24 часа при температуре 37° С. На следующий день берут чашки из термостата и подсчитывают колонии.

Подсчет колоний проводят по следующей формуле:

$$X = (a \times 100) : V \quad \text{где,}$$

X- число ОКБ в 100 мл;

a - число подсчитанных колоний ОКБ в чашке;

V - посеянный объем воды на чашки, в которых велся подсчет колоний.

Например, после посева чашек в первом разведении было обнаружено 80 колоний, во втором 36 колоний, в третьем 20 колоний, а в четвертом 7 колоний. Для подсчета ОКБ берут чашку с разведением 10^{-3} . Полученные результаты посчитывают по формуле.

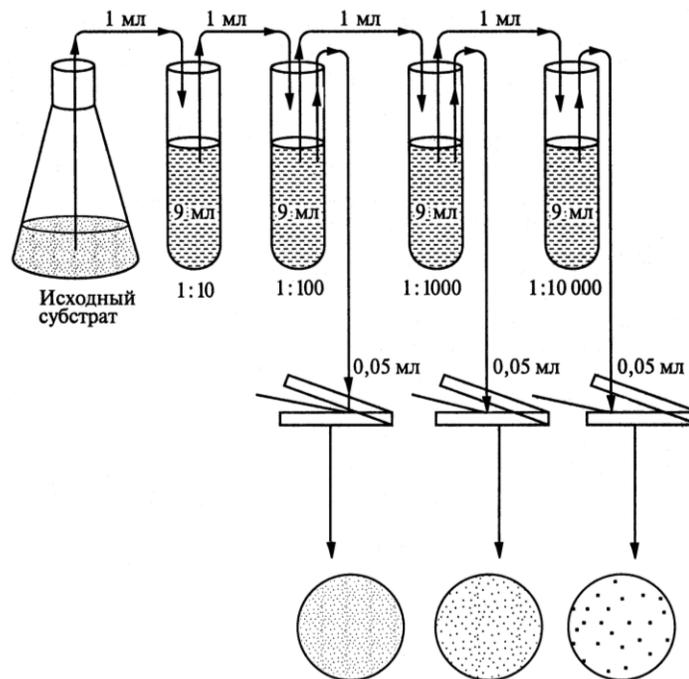


Рисунок 6. Посев исследуемого субстрата на чашки со средой.

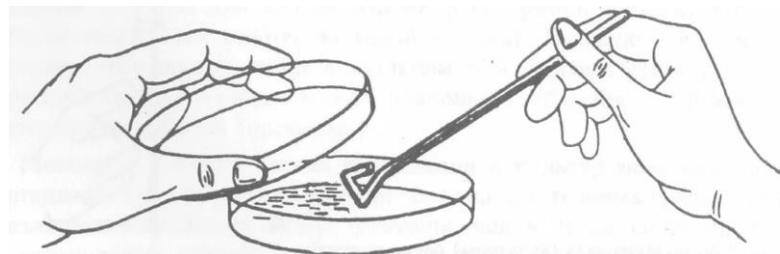


Рисунок 7. Распределение жидкости при помощи стеклянного шпателя.

Задание 1. На рисунке изображена засеянная чашка Петри после термостатирования. Необходимо провести подсчет колоний по формуле. Результаты запишите в тетрадь.

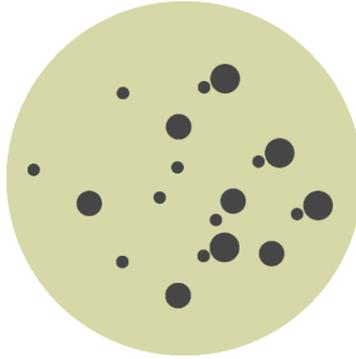


Рисунок 7. Колонии микроорганизмов.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение общим колиформным и термотолерантным бактериям
2. Расскажите методику определения общих колиформных бактерий в сточных водах
3. По какой формуле проводят подсчет колоний ОКБ чашках Петри со средой?

Тема 2. Проверка дистиллированной воды на бактериальную обсемененность

Цель работы: провести проверку дистиллированной воды на наличие микроорганизмов.

В микробиологических исследованиях воды дистиллированная вода используется для приготовления питательных сред, различных растворов, мытья лабораторной посуды, заправки паровых стерилизаторов.

Микробиологическая чистота воды очищенной (воды дистиллированной) должна соответствовать требованиям на воду питьевую, допускается содержание в ней не более 100 микроорганизмов в 1 мл при отсутствии бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Цель работы: провести исследование качества пробы дистиллированной воды.

Материалы и методы: чашки Петри, физраствор, среда дрожжевой триптон-соевый агар (ДТСА) или питательный агар, стеклянные градуированные пипетки с грушей, пробирки, стеклянный или пластмассовый шпатель,

Ход работы: Общее количество бактерий в воде определяют путем посева воды в стерильные чашки Петри с питательным агаром или дрожжевым триптон-соевым агаром (ДТСА). При исследовании дистиллированной воды делают посева по 1 мл определенных разведений воды (1:10- 1:100). Нормы по НД (ГОСТ ИСО 7218), КОЕ/см³ (1000) (Рис.8).

Чашки помещают в термостат при температуре 37° С на 24 часа (или при 20-22° С на 48 часов) и по истечении срока инкубации подсчитывают все колонии, выросшие как на поверхности агара, так и в глубине его выбирая чашки, в которых наиболее удобно произвести подсчет колоний. Общее количество бактерий определяют в пересчете на число колоний, выросших при посеве 1 мл воды.

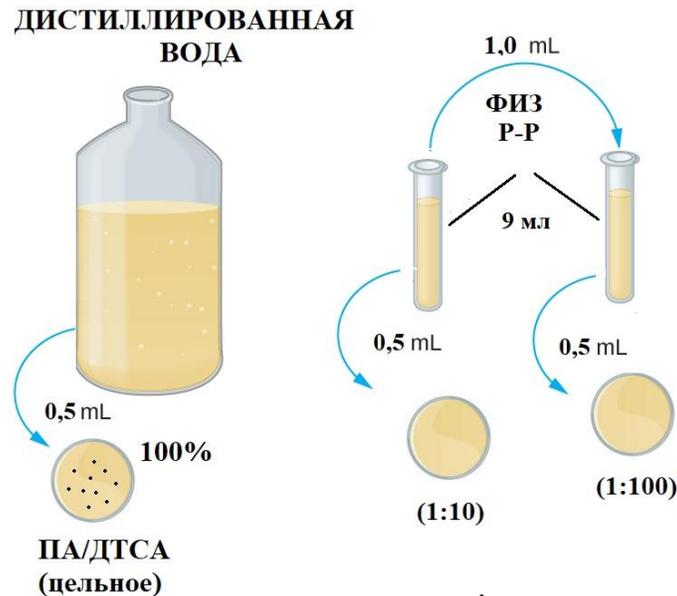


Рисунок 8. Исследование дистиллированной воды

Задание 1. Провести ряд десятикратных разведений дистиллированной или водопроводной воды.

Контрольные вопросы

1. Какие требования предъявляют дистиллированной воде? Какие бактерии не должны присутствовать в очищенной воде?
2. Для чего используется дистиллированная вода в микробиологических исследованиях?
3. Расскажите методику проверки дистиллированной воды на бактериальную обсемененность

Тема 3. Выделение микроорганизма из воздуха различными методами

Цель занятия: изучить два различных способа исследования воздуха.

Воздух является неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов в воздухе, поэтому микрофлора воздуха не так обильна, как микрофлора почвы и воды.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха проводят для определения количества МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) в 1 м³ и качественного состава (наличие санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов). МАФАНМ в воздухе определяют посевом на поверхность МПА, а количество санитарно-показательных микробов (стафилококков и стрептококков) определяют посевом на различные питательные среды (кровяной агар, питательный агар, среда Сабуро).

Контроль воздуха на обсемененность проводят седиментационным или аспирационным методом.

3.1. Седиментационный метод (метод Коха)

Суть метода заключается в осаждении микробных частиц и капель аэрозоли на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести.

Материалы и методы: чашки с питательным агаром, термостат.

Ход работы: Берут чашку Петри с питательным агаром и оставляют открытыми на 20 минут в исследуемом помещении. Затем чашки закрывают и помещают в термостат при температуре +37°С, если это МПА или кровяной агар, после чего культивируют в течение 48 ч; если это среда Сабуро — культивируют при температуре +25°С в течение 4–7 суток. Затем проводят подсчет выросших колоний во всей чашке. После подсчета выросших колоний в чашке Петри определяют количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха по формуле Омелянского, согласно которой в чашки с питательной средой площадью 100 см² в течение 5 мин оседает столько их содержится в 10 л воздуха.

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot t}$$

X- количество микробов в 1 м³;

a - количество колоний на агаре в чашке;

t - время (в минутах) экспозиции

5- время Омелянского;

10 - объем воздуха;

100 - площадь (коэффициент); 1000 - искомый объем в литрах.

Таблица 3

Определение диаметра и площади чашек Петри

Диаметр чашки	Площадь чашки (см ²)
8	50
9	63
10	78,5

Задание 1. Проверьте учебное помещение седиментационным методом (методом Коха). Определите сколько микроорганизмов содержится в 10 л воздуха. Расчеты и результат запишите в тетрадь.

3.2. Аспирационный метод микробиологического исследования воздуха

Аспирационные методы основаны на принудительном осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхность плотной питательной среды или в улавливающую жидкость (мясо-пептонный бульон, буферный раствор, изотонический раствор хлорида натрия и др.). Аспирационные методы используют при исследовании воздуха, как закрытых помещений, так и атмосферного. В настоящее время широко применяется при исследовании воздуха закрытых помещений прибор Кротова. Принцип работы этого аппарата основан на том, что воздух, просасываемый через клиновидную щель в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды, при этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе.

Чашку Петри с тонким слоем среды укрепляют на вращающемся столике аппарата, что обеспечивает равномерное распределение бактерий на ее поверхности. Работает аппарат от электросети. После отбора пробы с определенной экспозицией чашку вынимают, закрывают крышкой и помещают на 48 ч в термостат. Обычно отбор проб проводят со скоростью 20-25 л/мин в течение 5 мин.

Таким образом, определяется флора в 100-125 л воздуха. При обнаружении санитарно-показательных микроорганизмов объем исследуемого воздуха увеличивают до 250 л.

Контрольные вопросы

1. В чем суть седиментационного метода (метода Коха)?
2. В чем суть методики аспирационного микробиологического метода исследования кормов?
3. Проведите расчеты по формуле Омелянского

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ И ПОСЕВА НА ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Цель занятия: освоить количественный учет микроорганизмов методом последовательных разведений и посева на плотные питательные среды.

Во многих сферах микробиологии количественный учет микроорганизмов не менее важен, чем качественный. Это касается как почвенной или водной

микробиологии, так и медицинской. Во всех случаях необходимо оценить бактериальную нагрузку чего-либо микроорганизмами: в первом случае для того, чтобы сделать экологическое описание той или иной среды, а во втором – чтобы оценить степень заражения и назначить адекватную терапию.

Оценивать количество микроорганизмов можно различными способами:

– прямым подсчетом различными методами (в камере Горяева, методом Виноградского – Брида, на мембранных фильтрах, капиллярным методом);

– косвенными методами, основанными на разведении суспензии клеток и высевом их на питательные среды (методом Коха).

и на расчете различных показателей, изменяющихся в зависимости от количества микроорганизмов (оптическая плотность в нефелометрическом методе).

Тема 1. Прямые методы

Камера Горяева – особое предметное стекло с нанесенной на него микроскопической сеткой (Рисунок 10). Подсчет клеток в камере Горяева осуществляется в больших или малых квадратах сетки в зависимости от размеров микроорганизмов.

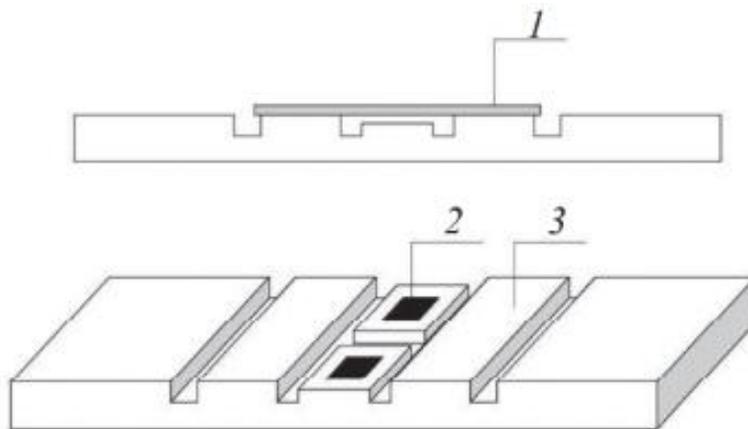


Рисунок 10. Камера Горяева. 1 – покровное стекло; 2 – микроскопическая сетка; 3 – площадки для притирания стекла.

Сетка нанесена на поверхность стекла, расположенного строго на 0,1 мм ниже, чем соседние площадки. Они используются для притирания специального толстого покровного стекла к камере. Образование радужных колец (колец Ньютона) в месте площадок говорит о том, что притирание прошло успешно и объем камеры соответствует заявленному (Рисунок 11).

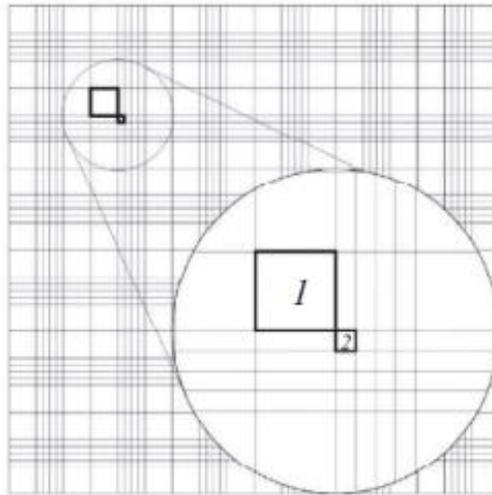


Рисунок 11. Сетка камеры Горяева. 1 – большой квадрат сетки; 2 – малый квадрат сетки.

Метод Виноградского – Брида заключается в подсчете микроорганизмов на фиксированных окрашенных мазках в полях зрения. Для этого на предметном стекле с помощью миллиметровой бумаги вычерчивают прямоугольник с определенной площадью и готовят фиксированный окрашенный мазок суспензии клеток известного объема по площади этого прямоугольника.

Подсчет производят в полях зрения, предварительно высчитав их площадь (обычно с помощью объект-микрометра).

Два этих метода являются прямыми методами подсчета. На каждое разведение необходимо подсчитать не менее 600 клеток. Метод подсчета клеток на мембранных фильтрах используется для количественного учета микроорганизмов с низкими плотностями клеток.

Определенный объем пробы исследуемого субстрата отделяют через фильтры с определенным размером пор, а затем окрашивают и подсчитывают клетки с помощью микроскопа с окулярной сеткой.

Тема 2. Косвенные методы

Цель занятия: освоить различные методы количественной оценки микроорганизмов и возможности их сопоставления.

Нефелометрический метод. Те же самые разведения, которые использовались при прямых методах подсчета, будут использованы для измерения оптической плотности с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) и составления калибровочной кривой.

Построение графика по соотнесению данных прямого подсчета микроорганизмов с данными ФЭК позволяет получить формулу для перевода этих данных в количество микроорганизмов. В дальнейшем подобная формула позволяет существенно экономить время и исследовать культуры клеток только на ФЭК, минуя прямые методы подсчета.

Метод Коха основан на посеве определенного объема трех конечных разведений на три чашки Петри с питательной средой. В конечных разведениях клеток должно быть не очень много, чтобы каждая из них образовывала изолированную колонию, но и не очень мало (если колоний на чашке Петри будет меньше десяти, то этот результат нельзя использовать для подсчета). Каждая изолированная колония – потомство одной клетки, что позволяет соотнести количество выросших колоний с количеством клеток. Для равномерного распределения клеток обычно используют шпатель Дригальского.

Материалы и методы: суспензия культуры дрожжей, пробирки для разведения культуры со стерильной водопроводной водой, чашки Петри со средой Сабуро для выращивания дрожжей, стерильные шпатели Дригальского, 3 шт. на группу, камеры Горяева, миллиметровая бумага, предметные стекла, спиртовки и зажигалки, микроскопы, объект-микrometer, ФЭК, кюветы к нему, стерильная чистая среда для контроля, фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло, сэмплеры и стерильные наконечники к ним.

Задание 1. Приготовление серии разведений исходной суспензии (Табл. 4)

Приготовить 7 пробирок с 5 мл стерильной воды в каждой. Подписать пробирки (1–7). В пробирку № 1 внести 5 мл исходной суспензии, перемешать сэмплером и сменить наконечник.

В пробирку № 2 внести 5 мл из пробирки № 1, перемешать сэмплером и сменить наконечник. Каждый раз с помощью нового наконечника проделывать ту же процедуру с оставшимися пробирками.

Важно! Нельзя погружать кончик наконечника слишком сильно в раствор, откуда производится забор материала.

Таблица 4

Серия разведений культуры *Saccharomyces cerevisiae*

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Разведение (раз)	2	4	8	16	32	64	128

Задание 2. Посев на чашки Петри для подсчета методом Коха. В асептических условиях пипеткой внести 50 мкл суспензии из пробирки № 7 на чашку Петри, распределить по ней этот объем с помощью стерильного шпателя Дригальского.

Подписать чашку Петри: видовое название, разведение, дата, группа. Повторить процедуру с пробирками № 5 и 6. Сразу их подписать. Поставить чашки Петри в термостат на 37 °С.

Подсчитать количество выросших колоний на следующем занятии и вычислить количество клеток в исходной суспензии по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятой для посева;

10^n – коэффициент разведения.

Внести данные в таблицу 5.

Контрольные вопросы

1. Расскажите про прямые методы подсчета микроорганизмов?
3. В чем суть косвенных методов исследования микроорганизмов?
3. Чем нефелометрический метод подсчета микроорганизмов отличается от метода Коха?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

АЭРОБНОЕ И АНАЭРОБНОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ

Цель работы: изучить возбудителей брожения целлюлозы.

Целлюлоза - наиболее распространенный полисахарид растительного происхождения. Поэтому чрезвычайно велика роль целлюлозоразрушающих микроорганизмов в круговороте углерода и различных минерализационных процессах. Целлюлозу разлагают разнообразные аэробные и анаэробные бактерии и грибы.

Аэробное разложение. Группа аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов широко распространена в почве. Это бактерии родов Цитофага - *Cytophaga* и Спороциитофага - *Sporocytophaga*, очень требовательные к среде и в большом количестве встречающиеся в навозе и почвах, удобренных навозом. Представители рода Целлюломонас - *Cellulomonas* также разрушают целлюлозу. Это грамположительные подвижные палочковидные бактерии, по мере старения их клетки меняют форму и становятся шаровидными. Виды рода *Cellulomonas* разлагают целлюлозу в аэробных условиях. Они присутствуют в почвах, богатых минеральными формами азота. В разложении целлюлозы участвуют также миксобактерии, актиномицеты и грибы.

Анаэробное разложение. Анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии относятся в основном к роду *Clostridium*. Эти бактерии обитают в компостах, навозе, речном иле и сточных водах, встречаются в нейтральных и кислых почвах. Типичный представитель рода *Clostridium omelianskii* был выделен в 1902 г. известным микробиологом В. Л. Омелянским. Клетки этого микроорганизма палочковидной формы (длина 4-8 мкм и ширина 0,3-0,5 мкм), подвижные. У них образуются толстые споры, поэтому спорообразующая клетка сильно раздувается и становится похожей на барабанную палочку. *C. omelianskii* - мезофил, разлагает целлюлозу при 30-40 °С.



Рисунок 12. Возбудитель брожения клетчатки *Clostridium Omelianskii*:
 а) молодые палочки; б) клетки со спорами; в) споры.

В почве, навозе и компостах встречаются также термофильные анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии, развивающиеся при температуре 60-70 °С. Они активно сбраживают целлюлозу. В рубце жвачных присутствуют специфические целлюлозоразлагающие бактерии *Selenomonas ruminantium*. Это облигатные анаэробы, разрушающие целлюлозу кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот, спиртов, CO₂ и H₂. Бактерии рубца имеют большое значение в питании жвачных.

При разрушении целлюлозы микроорганизмами сначала происходит гидролиз целлюлозы до глюкозы под влиянием ферментов. Конечные продукты аэробного распада целлюлозы - в основном CO₂ и H₂O, анаэробного - этиловый спирт, уксусная, молочная, муравьиная и масляная кислоты, а также CO₂ и H₂O.

Материалы и оборудование: фильтровальная бумага, колбы круглые плоскодонные на 150-200 мл, пробки, пинцеты, предметные и покровные стекла, микроскопы.

Растворы и реактивы: Соли - KNH₄HPO₄ (сегнетова соль), KH₂PO₄, CaCl₂, MgSO₄, CaCO₃; почва, раствор фуксина, пептон 0,1.

Ход работы: В круглую плоскодонную колбу вносят 1-2 г фильтровальной бумаги (или вату), нарезанной мелкими полосками, и доверху заливают средой следующего состава (в %): KNH₄HPO₄ - 0,2; KH₂PO₄ - 0,1; CaCl₂ - 0,03; пептон - 0,1; MgSO₄ - 0,05; CaCO₃ - 0,5. Затем в эту среду помещают небольшое количество почвы и закрывают колбу пробкой с отверстием для выхода газов.

Через несколько дней при температуре 30-35 °С начинается брожение клетчатки, которое длится 2-3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизняется, желтеет и постепенно разрушается бактериями. Пинцетом со дна колбы берут кусочек разлагающейся бумаги и размазывают его по предметному стеклу (без добавления воды). Мазок сушат, фиксируют над пламенем горелки, окрашивают фуксином и микроскопируют.

В колбах, инкубируемых при температуре 30 °С, развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце - *Clostridium omelianskii*.

В тетрадь зарисовывают результаты микроскопического изучения возбудителей брожения клетчатки.

Задание 1. Зарисуйте и напишите латинское название трех представителей микроорганизмов, участвующих в разложении клетчатки. По три представителя: а) в анаэробных условиях; б) в аэробных условиях.

Контрольные вопросы

1. Что такое целлюлоза и какова ее роль?
2. Расскажите про аэробное разложение.
3. Назовите бактерии, сбраживающие целлюлозу.
4. Как провести опыт по брожению целлюлозы?
5. Как приготовить препарат целлюлозоразлагающих анаэробов для микроскопического изучения?
6. Чем отличаются возбудители процесса разложения клетчатки в аэробных условиях от возбудителей этого процесса в анаэробных условиях?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6 МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ УГЛЕВОДОВ. ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ

1. Выделение маслянокислых бактерий

Цель занятия: познакомиться с химизмом маслянокислого брожения, с качественными реакциями на масляную кислоту, с морфологией масляно-кислых бактерий. Выделить культуру маслянокислых бактерий рода *Clostridium*.

Клостридии (Clostridium). Бактерии рода клостридиев являются облигатными анаэробами. На поверхности твердого субстрата они образуют плотные выпуклые колонии правильной формы, непрозрачные, кремового или белого цвета.

Молодые клетки имеют палочковидную цилиндрическую форму, прямую или слегка изогнутую с закругленными концами. Большинство видов - грамположительные, подвижные. Движение осуществляется с помощью жгутиков. По мере старения клетки теряют подвижность, накапливая запасное вещество типа крахмала (гранулезу), и переходят к спорообразованию. Диаметр спор, как правило, превышает диаметр клетки, поэтому клетка со спорой внутри может принимать форму веретена или барабанной палочки.

Роль в природе. С жизнедеятельностью клостридиев связаны процессы разложения (гниения) азотсодержащих остатков (белков, нуклеиновых кислот) в анаэробных условиях, а также разложение таких растительных материалов как клетчатка, пектины и грибной хитин. Маслянокислые микроорганизмы приносят вред, вызывая порчу картофеля и овощей, вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов и силоса.

Маслянокислое брожение. Это процесс превращения бактериями в анаэробных условиях углеводов, спиртов и других органических веществ в масляную кислоту (бутират). Суммарное уравнение процесса: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2 CO_2 + H_2 + \text{Эн.}$

При этом брожении кроме масляной кислоты накапливаются побочные продукты – бутанол, этанол, ацетон, органические кислоты (уксусная, капроновая, каприловая).

Маслянокислое брожение широко распространено в природе. Маслянокислые бактерии обитают там, где много органического вещества и нет доступа воздуха – в иловых отложениях водоемов, в почве, в скоплениях разлагающихся отходов, в навозе, в сточных жидкостях и т.п. Развитие этих бактерий в почве, где достаточно воздуха, становится возможным благодаря симбиозу с аэробными бактериями, использующими кислород. Маслянокислое брожение играет важную роль в цепи превращений органических веществ при минерализации.

Необходимо:

1. Выделить культуру маслянокислых бактерий.
2. Познакомится с химизмом маслянокислых бактерий. Сделать качественные реакции на масляную кислоту, записать уравнения реакций.
3. Познакомиться с морфологией маслянокислых бактерий. Приготовить препараты «раздавленная капля», окрасить по Граму, рассмотреть с иммерсией, зарисовать.

Материалы и оборудование: пробирки на 20 см³, пипетки на 10 см³, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, промывалки.

Растворы и реактивы: раствор 5 % FeCl₃, 96 % этиловый спирт, конц. H₂SO₄, раствор Люголя, раствор карболового фуксина (фуксин Циля), дистиллированная

Объекты исследования: картофель.

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой анаэробных спороносных бактерий рода *Clostridium*. Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий.

Схематично процесс можно выразить следующим образом:



Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений.

Ход работы: для получения культуры маслянокислых бактерий рода *Clostridium* за 5 дней до начала занятий закладывают опыт. Неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками и помещают в 5 пробирок. Пробирку

заполняют на 1/3 объема. В пробирки добавляют щепотку мела, и заполняют дистиллированной водой на 2/3 объема. Пробирки аккуратно помещают в водяную баню при температуре 80 °С на 10–15 мин. После этого закрывают ватно-марлевыми пробками и ставят в термостат с температурой 35 °С на 5 дней. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения.

Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспорные формы других видов, убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

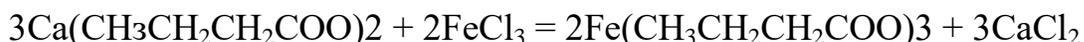
2. Качественные реакции на масляную кислоту

2.1. Получение маслянокислого железа

Материалы и оборудование: пробирка, спиртовка, градуированная пипетка с грушей.

Растворы и реактивы: 5%-го раствор хлорного железа (III).

Ход работы: в пробирку наливают 3-5 мл сброженной жидкости, добавляют 1 - 2 мл 5%-го раствора хлорного железа (III) и нагревают на спиртовке. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато-коричневое окрашивание, а в проходящем свете - кроваво-красное. Реакция идет по уравнению:



2.2. Получение масляноэтилового эфира

Материалы и оборудование: пробирка, спиртовка, градуированная пипетка с грушей.

Растворы и реактивы: 96%-ый этиловый спирт, крепкая серная кислота.

Ход работы: К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке прибавляют 0,5 мл 96%-го этилового спирта и 1 - 2 мл крепкой серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется характерный запах масляноэтилового эфира (запах ананаса). Реакция протекает по уравнению: $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2 + 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} = 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 + \text{Ca}(\text{OH})_2$

Кроме того, если в накопительной культуре содержится значительное количество масляной кислоты, то ее легко различить по запаху прогоркшего масла. Результаты качественных реакций на масляную кислоту отразить в тетрадах.

Задание 1. Проведите маслянокислое брожение углеводов (качественную реакцию на масляную кислоту и получение масляноэтилового эфира).

Контрольные вопросы

1. Что из себя представляют бактерии рода Clostridium? В каких условиях возможно развитие бактерий рода Clostridium?
2. В чем сущность маслянокислого брожения?
3. Изобразите схематично процесс маслянокислого брожения.
4. Опишите качественные реакции на масляную кислоту.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ЗНАКОМСТВО С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ АММОНИФИКАЦИИ, ДЕНИТРИФИКАЦИИ И АЗОТФИКСАЦИИ И ПРОДУКТАМИ ИХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Цель занятия: ознакомиться с техникой проведения аммонификации, денитрификации, азотфиксации и их возбудителями, методами выявления продуктов их жизнедеятельности, ответить на вопросы теста.

Аммонификация. Микроорганизмы, вызывающие аммонификацию органических веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты, под действием которых эти вещества гидролизуются до аминокислот. Аминокислоты поступают в клетку и в ней дезаминируются с образованием аммиака, органических кислот и других продуктов (сероводород, меркаптан, индол, скатол).

Материалы и оборудование: стеклянные градуированные пипетки с грушей, микроскопы, шпатели, цилиндры на 100 мл, колбы Эрленмейера на 100 мл, полоски красной лакмусовой бумажки, вата, белые фарфоровые пластинки с лунками, ватные пробки.

Растворы и реактивы: реактив Несслера, реактив дифениламин в крепкой серной кислоте, цинк-йод-крахмал, 10%-ный р-р серной кислоты, среда для аммонификации, питательная среда Гильтая, почва, 3% пептон, зафиксированные корни разных бобовых растений с клубеньками, ботанические бритвы.

Ход работы: для изучения аммонификации органических веществ в качестве питательной среды используют мясной бульон с добавлением 3% пептона. По 30 мл среды разливают в 4-5 колб Эрленмейера на 100 мл и добавляют по 0,5 чайной ложки почвы.

Колбы закрывают ватными пробками. Над средой подвешивают две бумажки – красную лакмусовую, смоченную дистиллированной водой для обнаружения выделяющегося аммиака, и фильтровальную, смоченную щелочным раствором ацетата свинца для выявления сероводорода и меркаптана, закрепляя их между пробками и стенками горлышка колбы. Бумажки не должны касаться среды. Сверху колбы прикрывают пергаментной бумагой.

На 3-5-е сутки инкубации при 28-30° С опыт заканчивают и содержимое колбы анализируют. Для обнаружения возбудителей готовят препарат живых

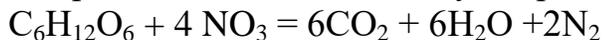
бактерий в раздавленной капле, а также фиксированный и окрашенный. Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки *Proteus bulgaris*, преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Также на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides* и *Clostridium putrificus*. *Bacillus mycoides* вызывают аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях, а *Clostridium putrificus* – в анаэробных.

1. Качественные реакции на продукты гнилостного распада белка

1.1. Проба на индол

Пользуются реакцией Сальковского или реакцией с парадиметиламидобензальдегидом. В первом случае к 10 мл субстрата добавляют 1 мл 0,2%-ного KNO_2 и несколько капель концентрированной серной кислоты. При взаимодействии этих веществ с индолом получается красно-фиолетовое окрашивание. Вторая реакция: к 10 мл субстрата добавляют 5 мл парадиметиламидобензальдегида и 5 мл насыщенного сульфата калия. При наличии индола возникает интенсивно красное окрашивание.

Денитрификация. В почве совершается ряд процессов, в результате которых окисленные формы азота (нитраты, нитриты) восстанавливаются в окислы азота или молекулярный азот. Это приводит к существенным потерям из почвы ценных для растений соединений. Суммарно этот процесс выражают уравнением:



Восстановление нитратов и нитритов до газообразных азотных соединений происходит в результате процессов прямой и косвенной денитрификации. Под прямой денитрификацией подразумевают биологическое восстановление нитратов, а под косвенной — химическое восстановление нитратов. Прямая, или биологическая, денитрификация, в свою очередь, разделяется на процессы двух типов — ассимиляторную и диссимиляторную денитрификации. При ассимиляторной денитрификации нитраты восстанавливаются до NH_3 , который служит источником азота для построения клеточных веществ.

В процессах диссимиляторной денитрификации нитраты используются в качестве окислителя органических веществ вместо молекулярного кислорода, что обеспечивает микроорганизмы необходимой энергией. Эти энергетические процессы называются процессами нитратного дыхания.

Способностью диссимиляторной денитрификации обладают только специфические аэробные бактерии. Преобладающими родами денитрификаторов в почве являются *Pseudomonas*, *Paracoccus*.

Помимо названных мезофильных микроорганизмов, денитрификацию могут вызывать и термофильные бактерии, развивающиеся при температуре 55-65° С. Это спорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*.

Денитрифицирующие бактерии используют нитраты, в качестве акцептора водорода при отсутствии O_2 для окисления органических веществ. При нитратном дыхании органические вещества полностью окисляются до CO_2 и H_2O .

Таким образом, денитрификаторы растут аэробно без нитратов или анаэробно в их присутствии. Большинство органических субстратов, использующихся в аэробном окислении, может быть потреблено при отсутствии O_2 , но с нитратами в среде. Существование денитрификаторов в анаэробных условиях обеспечивают не только нитраты, но и нитриты.

В зависимости от вида микроорганизма, осуществляющего диссимиляторную денитрификацию нитратов или нитритов, конечными продуктами этих процессов являются N_2 , N_2O , NO .

Начальный этап восстановления нитратов при диссимиляторной денитрификации катализируется ферментом нитратредуктазой. Образование этого фермента в клетках микроорганизмов происходит под воздействием нитрата только в анаэробных условиях. В присутствии кислорода воздуха синтез нитратредуктазы не происходит.

Для наблюдения процесса денитрификации пользуются средой Гильтая, состоящей из двух растворов:

1 раствор – KNO_3 – 2,1 г, аспарагин – 1,0, дистиллированная вода – 250 мл.

2 раствор – лимоннокислый натрий – 5,0 г, KH_2PO_4 – 2,0, $MgSO_4$ – 2,0, $CaCl_2$ – 2,0, $FeCl_3$ – следы, дистиллированная вода – 500 мл.

Растворы сливают вместе, устанавливают pH 6,8-7,0 и доводят до 1 л.

Растворы и реактивы: 1 раствор – KNO_3 – 2,1 г, аспарагин – 1,0, дистиллированная вода – 250 мл; 2 раствор – лимоннокислый натрий – 5,0 г; KH_2PO_4 – 2,0, $MgSO_4$ – 2,0, $CaCl_2$ – 2,0, $FeCl_3$ – следы, дистиллированная вода – 500 мл, вазелиновое масло, дифениламин, H_2SO_4 ,

Материалы и оборудование: колба Эрленмейера, почва, каучуковая пробка, стеклянная трубка, термостат, фарфоровая пластинка.

Ход работы: в колбу Эрленмейера наливают немного питательной среды, добавляют 1/3 чайной ложки почвы. Среду перемешивают с почвой для удаления пузырьков воздуха, наполняют колбу питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, слабо расширенная в средней части.

Пробка вытесняет часть жидкости, которая входит в трубку. В нее над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем, и в колбе создаются анаэробные условия. Отсутствие углеводов исключает процесс брожения.

В этих условиях будут развиваться лишь микроорганизмы, способные использовать кислород связанных соединений (в первую очередь нитратов). Колбы со средой и почвой помещают в термостат при температуре 30-35°C. При постановке опыта устанавливают наличие в среде нитратов.

Для этого к капле дифениламина с серной кислотой, нанесенной на фарфоровую пластинку, добавляют каплю субстрата; капля окрашивается в темно-синий цвет. После 5-6 дней инкубации культуру анализируют: отмечают появление пузырьков газа (CO_2 и N_2) под пробкой.

Наблюдается позеленение питательной среды, что указывает на появление в ней *Pseudomonas fluorescens* или *Pseudomonas putrescens*. *Pseudomonas putrescens* чаще всего развиваются на среде с лимонной кислотой. На среде с сегнетовой солью развивается *Bact. Stutzeri*.

Для проведения качественных реакций проводят пробу на нитраты (NO_3) с дифениламином и нитриты (NO_2) с цинк-йод-крахмалом в кислой среде, а затем на аммиак с реактивом Несслера. После 6 дней инкубации реакции на нитраты и нитриты бывают отрицательными. Часть нитратов восстанавливается до аммиака, основная же масса азота нитратов восстанавливается до молекулярного азота, о чем свидетельствует обильное образование газов (CO_2 и N_2).

Азотфиксация. Это связывание (ассимиляция) молекулярного азота атмосферы и перевод его в азотистые соединения. Биологическая азотфиксация осуществляется клубеньковыми бактериями, живущими в симбиозе с высшими растениями (симбиотическая азотфиксация), а также свободноживущими азотфиксаторами - азотобактером, цианобактериями, спириллами, энтеробактериями, микобактериями (несимбиотическая азотфиксация). Азотфиксация играет важную роль в круговороте азота в природе и обогащении почвы и водоемов связанным азотом (симбиотическая азотфиксация ежегодно может обогащать 1 га почвы на 200-300 кг азота, несимбиотическая - на 15-30 кг).

Клубеньковые бактерии. Их можно просматривать непосредственно в ткани клубеньков люпина, гороха, вики, фасоли и др. Острой ботанической бритвой готовят очень тонкий продольный или поперечный срез клубенька, затем в раздавленной капле на предметном стекле наблюдают под микроскопом при разных увеличениях и с помощью иммерсионной системы объектива.

Для точной зарисовки их внешней формы и определения стадии развития готовят фиксированный и окрашенный фуксином препарат. Разрезают клубенек на две части, и место разреза многократно прокалывают стерильной препаровальной иглой, вызывая возможно большее механическое разрушение клеток клубенька. Из механически поврежденного клубенька отжимают каплю жидкости на предметное стекло и, разбавив ее каплей дистиллированной воды, готовят окрашенный препарат. В препарате обнаруживают разных размеров и форм, в том числе и ветвистых форм, бактериоиды клубеньковых бактерий – *Bact. Radicicola*.

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Из них наибольший интерес представляют *Azotobacter* и бактерии рода *Clostridium*. *Clostridium pasteurianum* фиксирует азот из атмосферы в анаэробных условиях. Энергию для этого клетки получают за счет маслянокислого брожения.

1.2. Выявление анаэробных азотфиксаторов

Материалы и оборудование: колба Эрленмейера,

Реактивы: безазотистая среда С.Н. Виноградского, мел, дистиллированная вода.

Ход работы: для выявления анаэробных азотфиксаторов используют безазотную среду С.Н. Виноградского: глюкоза – 20,0 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $MgSO_4$ – 0,5, $NaCl$ – 0,5, дистиллированная вода – 1000 мл. В колбу Эрленмейера (100-150 мл) наливают на 2/3 колбы питательную среду, добавляют четверть чайной ложки мела. Для заражения в среду вносят 1/2 чайной ложки почвы, колбы ставят в термостат при 25-30°C. Через несколько дней поверхность жидкости покрывается пленкой аэробных бактерий, а на дне колбы начинается маслянокислое брожение с выделением газа.

Анализ проводят после 5-6 дней инкубации. *Clostridium pasteurianum* обычно находится в осадке мела и почвы. Для его обнаружения содержимое колбы хорошо размешивают и дают осесть грубым частицам. Затем из середины субстрата пипеткой берут немного среды и каплю наносят на предметное стекло. К ней добавляют каплю йода в йодистом калии ($J : KJ = 1 : 2$), накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией. Клетки *Clostridium pasteurianum* содержат в цитоплазме гранулезу (полисахарид, близкий к крахмалу), которая от раствора J в KJ приобретает синий цвет. Среди них преобладают веретенообразные формы с продолговатыми спорами. Реакция на масляную кислоту: в пробирку прилить 5 мл субстрата, добавить 2 мл хлорного железа, нагреть до кипения. Образующийся раствор маслянокислого железа имеет кроваво-красный цвет.

Azotobacter. Для выявления его в почве, опыт проводят на гелевых пластинах. Их отмывают от хлора и пропитывают 3-5 мл питательной среды следующего состава: манит или тростниковый сахар – 20,0 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $MgSO_4$ – 0,5, $NaCl$ – 0,5, $FeSO_4$ – 0,01, $MnSO_4$ – 0,01, $CaCO_3$ – 5,0 г, дистиллированная вода – 200 мл; смесь микроэлементов: H_3BO_3 – 5 г, $(NH_4)_2MoO_4$ – 5 г, KJ – 0,5 г, $NaBr$ – 0,5 г, $ZnSO_4$ – 0,2 г, $Al_2(SO_4)_3$ – 0,3 г, дистиллированная вода – 1000 мл. Смесь упаривают до исчезновения избыточной влаги, затем на поверхность геля раскладывают по трафарету 50 комочков почвы. Чашки помещают во влажную камеру в термостат при 28-30 °C. На 6-7 сутки инкубации комочки почвы обрастают слизистыми колониями азотобактера. Если комочки почвы обрастают колониями *Azotobacter chroococcum*, то они со временем приобретают бурую окраску.

Azotobacter agile и *Azotobacter vinelandii* создают колонии, которые вызывают заметную флюоресценцию среды. *Azotobacter beijerinckii* – колонии слизистые, бесцветные, их можно обнаружить в красноземах. Для ознакомления с возбудителями аэробной фиксации из колоний готовят окрашенные препараты и

просматривают под иммерсией. Клетки азотобактера шаровидные, чаще встречаются диплококки.

Задание 1. Законспектировать технику проведения аммонификации, денитрификации, азотфиксации. Зарисуйте и напишите латинское название в тетради анаэробных представителей азотфиксаторов и микроорганизмов участвующих в денитрификации.

Контрольные вопросы

1. Расскажите, в чем сущность аммонификации, какие качественные реакции на продукты аммонификации можно проделать?
2. Какие типы денитрификации вы знаете, в чем сущность процесса, какими микроорганизмами вызывается?
3. Что такое азотфиксация, какова роль в круговороте азота, какими микроорганизмами вызывается?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ, СБРАЖИВАЮЩИХ ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА (НА ЛЬНЕ). МИКРОСКОПИРОВАНИЕ

Цель занятия: получить накопительные культуры бактерий.

Накопительными называют такие культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов. Элективными называют условия, обеспечивающие преимущественное развитие определенной группы или вида микроорганизмов. При создании элективных условий учитывают особенности физиологии и метаболизма микроорганизмов: требования их к источникам питания, отношение к кислотности среды, аэрации, температуре, способность к образованию эндоспор и т.д.

Особенно часто элективные условия создают путем подбора соответствующей питательной среды. Источником для получения бактериальных культур, родовую и видовую принадлежность которых необходимо определить, могут служить почва, воздух, вода, пищевые продукты, надземные и подземные части растений, а также различные тканевые жидкости животных и человека, отделяемое ран, слизистой оболочки и т.д.

Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма за счет создания благоприятных условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его из популяции (Рисунок 13).

Получение накопительных культур

Материалы и оборудование. Накопительные культуры микроорганизмов, осуществляющих брожение пектиновых веществ, разложение клетчатки, микроскопы, оборудование для окрашивания препаратов.

Ход работы: Для выделения пектиноразрушающих бактерий используют льняную или крапивную питательную среду. Из стеблей готовят снопики длиной 5–7 см, помещают в пробирки, заливают водопроводной водой и кипятят 10–15 мин. Кипячением удаляют экстрактивные вещества, которые могут служить источником углерода для сопутствующих маслянокислых бактерий. Воду сливают, снопики заливают новой порцией воды, пробирки плотно закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. 20 мин. Когда пробирки остынут, среду заражают кусочком свежей соломы льна. Зараженные пробирки помещают в термостат при температуре плюс 35 °С. Через 3–5 суток начинается процесс пектинового брожения, жидкость мутнеет и пенится.

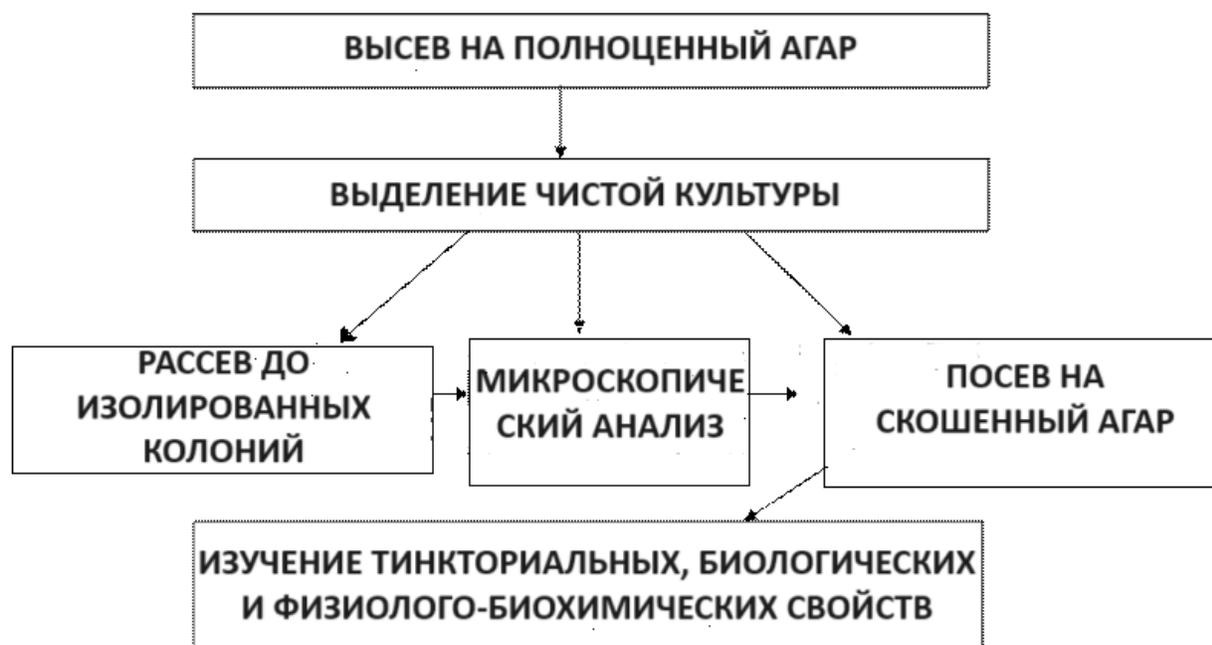


Рисунок.13. Этапы выделения чистых культур микроорганизмов

1. Микроскопирование

Для изучения морфологии бактерий пектинового брожения готовят прижизненные препараты. Снопик вынимают из пробирки, отжимают каплю жидкости на предметное стекло, готовят фиксированные и прижизненные препараты (в растворе Люголя). На препарате видны клетки *Clostridium pectinovorum* и *Clostridium felsineum*, вегетативные и спорующие, окрашенные иодом на гранулезу в темно-синий цвет.

Представители. Из разрушенных масс клетчатки в колбе микробиологической петлей готовят мазок в капле жидкости. Чаще всего на препарате обнаруживаются представители порядков *Mycobacteriales* и *Cytophagales* группы скользящих бактерий.

Род *Cytophaga* представлен длинными палочковидными клетками с заостренными концами, несколько изогнутыми (2–10 мкм). Колонии желтого, оранжевого, коричнево-бурого цвета, гладкие, слизистые.

Род *Cellvibrlo* представлен мелкими, слегка изогнутыми подвижными палочками (2–4 мкм). Колонии охряножелтые слизистые. Род *Cellfalcicula* имеет вид коротких толстых изогнутых палочек с заостренными концами (2,0*0,7 мкм).

Род *Sorangium* в молодой культуре имеет вид толстых слегка изогнутых палочковидных клеток с закругленными концами (2–5 мкм). При старении культуры образуются плодовые тела, состоящие из микроцист. Палочковидные клетки укорачиваются, покрываются толстой оболочкой, приобретая неправильные очертания. Колонии яркого-оранжевого, фиолетового цвета.

Род *Polyangium* представлен почти прямыми палочковидными клетками с закругленными концами (3,5–8 мкм). При старении формируются овальные микроцисты, которые соединяются и плодовые тела грушевидной формы. Плодовые тела желтого, оранжевого цвета, сидят непосредственно на субстрате.

Задание 1. Изучить микроорганизмы, участвующие в брожении пектиновых веществ, сделать рисунок и записать морфологию.

Задание 2. Запишите в тетради подробный конспект по получению накопительных культур (Рисунок 13).

Задание 3. Укажите и опишите основные методы получения накопительных культур.

Контрольные вопросы

1. Что такое накопительная культура?
2. Дайте определение слову элективная культура
3. Расскажите про этапы выделения чистых культур микроорганизмов.
4. Расскажите про виды микроорганизмов, участвующих в пектиновом брожении (морфология микроорганизмов)

РАЗДЕЛ 2. МИКРОБИОЛОГИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЧВЫ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ И ПОСЕВА НА ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Тема 1. Выделение микроорганизмов из почвы.

Цель занятия: освоить выделение микроорганизмов из почв методом почвенного разведения.

Микрофлора почвы очень многочисленна и разнообразна. Количественный и качественный состав почвенной микрофлоры зависит от типа почвы, ее химического состава, физических свойств, содержания влаги и воздуха, климатических условий, времени года, характера растительного покрова и многих других факторов. Одним из наиболее распространенных методов выделения почвенных микроорганизмов (т.е. их выявления и введения в культуру) является метод почвенного разведения, заключающийся в посеве на агаризованную питательную среду водной взвеси почвенных частиц.

Растворы и реактивы: среда Чапека, дистиллированная вода, стерильная вода, спирт.

Материалы и оборудование: колба с 90 мл стерильной воды, 3 пробирки с 9 мл стерильной воды, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, стерильные кружки фильтровальной бумаги, шпатель, металлический бюкс для высушивания почвы, технические весы, вата, водяная баня, образец почвы.

Ход работы.

1. Лабораторию стерилизуют бактерицидной лампой 20 минут.
2. Ватным тампоном, смоченным в спирте, протирают рабочее место.
3. Колбу с питательной средой Чапека ставят на водяную баню и нагревают до полного расплавления.
4. Расплавленную питательную среду разливают за пламенем горелки по стерильным чашкам Петри (по 10 мл в каждую), перемешивают осторожными покачиваниями и оставляют для застывания.
5. Почву взвешивают на технических весах (10 г), насыпая шпателем на стерильные кружки бумаги.
6. Взвешенный образец почвы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильной воды, и периодически осторожно взбалтывают круговыми движениями в течение 5 минут.
7. 1 мл полученной суспензии переносят стерильной пипеткой из колбы в пробирку с 9 мл стерильной воды и слегка взбалтывают, после чего таким же образом 1 мл полученной смеси из пробирки переносят в следующую пробирку.

Из пробирки третьего и четвертого разведения 1 мл суспензии переносят в стерильные чашки Петри с питательной средой Чапека.

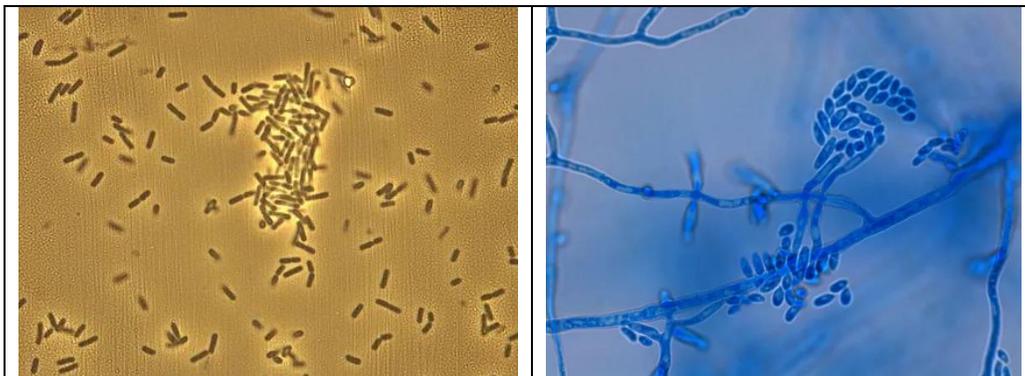
8. С целью ослабления роста бактерий питательную среду подкисляют молочной кислотой из расчета 4 мл на 1 л среды.

9. После посева чашки заворачивают в стерильные конверты и ставят в термостат для инкубации при температуре 23-25°C сроком на 10 суток.

10. Поскольку количество грибных и бактериальных зачатков рассчитывают на 1 г сухой почвы, следует из отобранного образца одновременно с посевом взять навеску почвы (10 г) и высушить в открытом бюксе в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 6 часов до постоянного веса.

Задание 1. Из предложенного списка выберите представителей почвенной микрофлоры? 1. *Bacillus subtilis* (сенная палочка); 2. *Pseudomonas fluorescens*; 3. *Micrococcus roseus*; 4. *Fusarium oxysporum*; 5. *Azotobacter chroococcum*; 6. *Clostridium felineus*.

Задание 2. Подпишите рисунки, укажите латинское название микроорганизмов.



Контрольные вопросы

1. От чего зависит количественный и качественный состав почвенной микрофлоры?
2. В чем суть метода почвенного разведения?
3. Назовите представителей почвенной микрофлоры.

Тема 2. Количественный учет микроорганизмов методом последовательных разведений и посева на плотные питательные среды

Цель занятия: освоить количественный учет микроорганизмов методом последовательных разведений и посева на плотные питательные среды. Состав микроорганизмов – важный параметр, позволяющий не только уточнить типологию почвы, но и оценить перспективы ее использования в различных областях сельскохозяйственного производства.

Количественный состав микроорганизмов – это величина, указывающая на общее число микроорганизмов в единице массы почвы (как правило – в 1 г).

Трудность определения этого параметра заключается в том, что подсчитать микроорганизмы в нативном образце почвы невозможно, а в культурах их число увеличивается по мере роста. Поэтому, в качестве учетной единицы при определении количества микроорганизмов используется колониеобразующая единица (сокращенно – КОЕ) – спора гриба или актиномицета, клетка бактерии и т.п., которая в культуре дает начало новой колонии.

Подсчет колониеобразующих единиц на практике сводится к подсчету образованных ими колоний, что возможно при прямом осмотре чашки Петри. Важно учитывать, что возраст культуры не должен быть слишком большим, иначе в ней появятся вторичные колонии, развившиеся из спор, образовавшихся уже в культуре.

Материалы и оборудование: чашки Петри с высеянными представителями почвенной микрофлоры, микроскопы, предметные и покровные стекла, пипетки, препаровальные иглы, бюксы с почвой после высушивания, определительная таблица и ключ.

Растворы и реактивы: 10% р-р КОН, дистиллированная вода

Ход работы: Взвесить бюксы с почвой после высушивания и определить вес сухой почвы. С обратной стороны чашку Петри разделить на квадраты и произвести отдельно подсчет выросших грибных и бактериальных колоний по каждому разведению с учетом посева на среду Чапека стандартную и подкисленную. Произвести подсчет грибных и бактериальных зачатков на 1 г сухой почвы по следующей формуле:

$$A = \frac{B \cdot V \cdot \Gamma}{D}$$

A – количество грибных (бактериальных) зачатков в 1 г сухой почвы;

Б – среднее количество колоний в чашке;

В – разведение, из которого сделан посев;

Г – количество миллилитров суспензии, высеянной в чашку;

Д – вес сухой почвы, взятой для анализа.

Результаты занести в таблицу.

Таблица 6

Количество микроорганизмов в почве

Тип почвы	Разведение	Количество грибных зачатков	Количество бактериальных зачатков

Выводы:

Контрольные вопросы

1. Что такое количественный состав микроорганизмов?
2. Согласно какой формуле осуществляют подсчет грибных и бактериальных зачатков на 1 г сухой почвы?

3. В чем суть количественный учет микроорганизмов методом последовательных разведений и посева на плотные питательные среды?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10 **МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРМОВ**

Цель занятия: освоить различные методики микроскопического исследования кормов.

При обнаружении поражений или подозрительных очагов на стеблях, соломинках, листьях, зерне обнаруженный грибной налет соскабливают и переносят в каплю физиологического раствора или воды, находящуюся на предметном стекле, покрывают покровным и просматривают под микроскопом.

При поверхностном поражении можно применять метод смыва спор. Зерно, солому и сено предварительно измельчают, заливают чистой водой и в течение 20 мин взбалтывают. Если споры плохо смываются водой, то их встряхивают в шюттель-аппарате в течение 10 мин; после центрифугирования осадок исследуют обычным способом. Каплю суспензии пипеткой наносят на предметное стекло, покрывают и просматривают под микроскопом. При наличии спороношения микроскопическим исследованием смыва можно определить род (*Fusarium*, *Aspergillus* и др.), а иногда и вид гриба.

Тема 1. Микологический анализ

Цель занятия: провести микробиологический анализ кормов.

Первичные посева. Для первичного выделения грибов из мучнистых, зерновых кормов используют обычно агаровую среду Чапека, а для выделения грибов из грубых кормов - влажные камеры. Для дифференциации видов и разновидностей грибов в каждом отдельном случае применяют специальные методы и приемы культивирования.

Заражение зерна грибами может быть поверхностным (заспорение) и глубинным (поражение). Для выявления глубинного поражения проводят дезинфекцию зерна 3%-м раствором формалина (за основу берут 40%-й формальдегид) или водным раствором сулемы (1 : 1000). Зерна (50 штук), завернутые в марлевую салфетку, помещают в стаканчик с дезинфицирующим раствором. Через 1-2 мин их переносят в стаканчик со стерильной водой, к которой для нейтрализации формалина добавляют 2-3 капли 5% -го раствора аммиака. Затем воду сливают и стерильным пинцетом переносят зерна на питательную среду (агар Чапека) так, чтобы они не соприкасались. Мелкие зерна (пшеница, овес, ячмень, рожь, просо и др.) раскладывают по 10 штук на чашке, крупные (кукуруза, бобы, горох) — по 5. Крупные зерна рекомендуется после дезинфекции разрезать пополам или расщепить. Число чашек при посеве мелких зерен должно быть не менее 5, а при посеве крупных — не менее 10.

Выявление поверхностной микрофлоры, необходимое для контроля зерна на зараженность патогенным грибом, проводят путем раскладывания зерен по поверхности среды без предварительной поверхностной дезинфекции. Число посеянных зерен должно быть не менее 20. Если имеется подозрение на поражение зерна грибами целлюлозоразрушителями (*Dendrodochium toxicum*, *Stachybotrys alternans* и др. Их сеют дополнительно во влажные камеры со средой Ван-Итерсона (или стерильной водой).

Для выделения грибов *Dendrodochium toxicum*, *Stachybotrys alternans* из грубых кормов применяют влажные камеры. На дно чашки Петри кладут тонкий слой ваты и на нее помещают кружок фильтровальной бумаги (по диаметру чашки), затем чашки стерилизуют и перед посевом фильтровальную бумагу увлажняют небольшим количеством стерильной среды Ван-Итерсона (или стерильной воды).

Солому, сено нарезают кусочками длиной по 2 см и переносят стерильным пинцетом в три чашки Петри с агаризированной средой, раскладывают их по 10 кусочков в каждую чашку, а в три влажные камеры помещают не менее 90 кусочков из той же пробы (по 30 кусочков в каждую чашку). Для выделения гриба *Dendrodochium toxicum*, развивающегося внутри стебля растения, стебель предварительно расщепляют или разрезают вдоль. Нарезанный силос и измельченный жмых для выделения грибов раскладывают по 10 кусочков на поверхности агара Чапека.

Для выделения грибов из муки, отрубей, комбикорма, шротов, мясокостной муки пользуются методом разливки. Для этого образец гранулированного или брикетированного корма предварительно размалывают на лабораторной мельнице. Корм (10 г) помещают в колбу со 100 мл стерильного 0,1%-го раствора поверхностно-активного вещества (ОП-7, ОП-10, твин-80) в дистиллированной воде. Затем пробу встряхивают на шюттель-аппарате в течение 15-20 мин.

Из полученной взвеси № 1 (1:10) готовят последующие разведения, используя также стерильные растворы вышеназванных поверхностно-активных веществ (ПАВ), следующим образом: 1 мл взвеси переносят стерильной градуированной пипеткой (конец пипетки следует обрезать для свободного прохождения частиц комбикорма, после чего пипетка должна быть откалибрована на 1 мл) в пробирку с 9 мл раствора ПАВ и получают взвесь №2 (1:100).

Из полученной взвеси № 2 готовят аналогичным образом взвесь № 3 (1 : 1000) и, если необходимо, взвесь № 4 (1:10000). Перед взятием очередной порции взвеси, как для получения дальнейшего разведения, так и для посева, необходимо тщательно перемешивать взвесь пипеткой, а также промывать пипетку во взвеси не менее 5 раз. Корм с нормальными органолептическими показателями разбавляют 1: 1000, подвергавшийся порче - 1: 10000.

Посев проводят сразу после приготовления последней взвеси (№ 3 или № 4), не давая ей отстояться. При этом 1 мл взвеси равномерно распределяют по всей

поверхности питательной среды. Число чашек, необходимых для посева, зависит от разведения: при разведении 1: 1000 требуется 5 чашек, при разведении 1: 10000 - 8.

Задание 1. Зарисуйте в тетради грибы вида *Dendrodochium toxicum* и *Stachybotrys alternans*, запишите их морфологию и культуральные свойства.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается суть метода смыва спор с растений?
2. Какие растворы используют для дезинфекции зерна при выявлении глубинного поражения?
3. Что применяют для выделения грибов *Dendrodochium toxicum* и *Stachybotrys alternans* из грубых кормов?
4. Какой метод используют для выделения грибов из муки, отрубей, комбикорма, шротов, мясокостной муки?

Тема 2. Культивирование посевов

Цель занятия: изучить технику культивирования посевов.

Чашки Петри с посевами закрывают в стерильную бумагу, помещают в термостат и выдерживают при температуре 22-25°C в течение 7-10 суток. Рост и спороношение грибов становятся заметными уже через 3 суток. Однако для идентификации грибов необходимо большее время культивирования — 5-7 суток. Для выявления гриба *Aspergillus fumigatus* в комбикормах пробу (10 г) взвешивают с точностью до 0,01 г и тщательно перемешивают. Корм высевают в разведении 1: 1000.

Выявление *Asp. fumigatus* в зерне проводят путем посева зерен без предварительной дезинфекции, однако для количественного учета гриба необходимо предварительно измельчить зерна и провести их посев способами, изложенными выше. Показателем степени засоренности корма грибом служит число диаспор (грибных зародышей) в 1 г исследуемого корма, которое определяют после подсчета выросших колоний с учетом количества посеянного материала и степени разведения.

Количественный учет грибов. В мучнистых кормах подсчет колоний после посева начинают на 2-3 сутки. Для облегчения подсчета дно чашки размечают карандашом на секторы или используют счетную камеру Воль-фюгеля. Проводят 2-3 последовательных подсчета. Общее число колоний данного вида гриба определяют в пересчете на 1 г исследуемого корма.

Пример расчета. 50 зерен пшеницы посеяно в 5 чашках с агаром. Во всех 5 чашках выросло 3 колонии *Fusarium sporotrichioides*, что составляет 6% числа посеянных зерен. Более точный учет грибов в зернофураже (а также в грубых кормах) можно провести, предварительно измельчив корм и посеяв так же, как мучнистые корма.

Задание 1. Зарисуйте в тетради грибы вида *Aspergillus fumigatus* и *Fusarium sporotrichioides*, запишите морфологию и культуральные свойства.

Контрольные вопросы

1. Как выявляют *Aspergillus fumigatus* в комбикормах?
2. Что служит показателем степени засоренности корма грибом?
3. Как проводят количественный учет грибов?

Тема 3. Выделение чистых культур грибов из первичных посевов

Цель занятия: изучить выделение чистых культур грибов из первичных посевов.

Родовую, а в ряде случаев и видовую принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве, однако часто вид гриба определяют после выделения его в чистую культуру. Для этого применяют два метода: метод непосредственного посева и метод деления. Получение чистых культур необходимо для дальнейшего изучения их токсигенности.

Метод непосредственного посева — иглой, загнутой под тупым углом, осторожно захватывают кусочек мицелия и помещают его на поверхность питательной среды. При этом следует избегать комкания, скручивания или прочих деформаций подвученного кусочка мицелия. В случае обильного спороношения у гриба сухой иглой переносят минимальное количество спор (метод сухой иглы). При работе с грибами нельзя производить посевы штрихом, а тем более зигзагообразным штрихом. Допускается только легкое касание в одном месте поверхности среды (если посев проводится в пробирку, то посередине ее) иглой, несущей споры или мицелий. Метод непосредственного посева возможен только тогда, когда в чашке с первичными посевами имеются достаточно чистые колонии или, когда необходимо возобновить чистую культуру с целью длительного поддержания культуры гриба. Метод деления применяют в двух случаях. Если колонии загрязнены другими грибами или бактериями. Это устанавливают обычно визуально, готовя 3-4 последовательных разведения взвеси спор гриба в стерильном 0,1%-м растворе твина-80 в воде, и высевают из одного-двух последних разведений по 1 мл на поверхность агара в чашки Петри, распределяя взвесь шпателем или наклоняя чашку в разные стороны.

При наличии обильного спороношения. Деление проводят с помощью посева — коснувшись стерильной влажной иглой (или крючком) ограниченного участка спороносящей поверхности, проводят штрихом по поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Культивируют посевы при 22-25°C. Сроки культивирования в зависимости от рода и вида гриба различны — до образования характерного спороношения. По истечении срока культивирования гриба проводят микроскопическое изучение колоний. При этом обращают внимание на

их цвет и форму, характер роста (распростертые или компактные), растущий край колонии (гладкий или извилистый), окраску субстратного мицелия, на наличие или отсутствие пигмента, выделенного в субстрат, цвет пигмента, на степень развития воздушного мицелия, наличие или отсутствие склероцитов.

Микроскопическое исследование грибов проводят, прежде всего, непосредственно в чашках, пользуясь только малым увеличением микроскопа (МБС-1, МБС-2). При этом выявляют наличие мицелиальных тяжей склероцитов плодовых тел, строение и характер ветвления спорангиеносцев или конидиеносцев, форму спорангия мукоровых грибов или головки аспергиллов, расположение конидий (цепочками или одиночно) и т. д. Затем готовят препараты для детального изучения морфологии гриба. Частицы гриба в зависимости от вида берут из различных мест колонии: в старых частях колонии из центра, в более молодых — по краям.

На предметное стекло наносят каплю фиксирующей жидкости. Затем иглой осторожно берут небольшое количество мицелия гриба, стараясь не повредить его, и вносят в каплю жидкости, аккуратно снимая его другой иглой. Препарат накрывают покровным стеклом, оттянув избыток жидкости кусочком фильтровальной бумаги. Фиксирующей жидкостью, наиболее пригодной для приготовления препаратов грибов из рода *Aspergillus*, *Penicillium* и ряда других, служит лакто-фенол Аммана (дистиллированная вода — 1 часть, молочная кислота — 1 часть, глицерин — 2 части, фенол — 1 часть). Прежде чем поместить материал в эту жидкость, его следует кратковременно обработать 70%-м этиловым спиртом. Для изучения грибов из рода *Fusarium* и некоторых других используют жидкость, состоящую из равных частей дистиллированной воды, этилового спирта и глицерина. При этом исследуемый материал не обрабатывают 70% -м этиловым спиртом. Для улучшения видимости контуров конидий и перегородок в них к 100 мл указанной жидкости добавляют 0,5-1 мл 0,01%-го водного или спиртового раствора метилового синего. Оба вышеназванных фиксатора позволяют хранить препарат в течение долгого времени. С помощью малого (x8, x10), а затем большого (x40, x90) увеличения микроскопа изучают препараты и, пользуясь специальными определителями с микроскопическими ключами, идентифицируют грибы. Определение токсичности культур грибов, выделенных из образцов кормов, необходимо проводить:

- если скармливание подозрительного по качеству корма вызвало заболевание или гибель подопытных животных;
- при положительной кожной пробе с воспалительной реакцией на коже кролика II, III степени;
- для установления роли выделенного из корма гриба в этиологии заболевания.

Токсичность культур грибов определяют: на парамециях, кожной пробой на кролике, введением различными способами культур грибов мышам и др.

Определение токсичности культур грибов на парамециях (*Paramecium caudatum*). Метод применяют для первичного установления токсичности культур как известных (*Fusarium*, *Stachybotrys alternans*, *Bendrodochium*, *Aspergillus* и др.), так и выделенных из кормов неизвестных грибов. Из культуры гриба на агаризованных средах (на среде Чапека, сусловом агаре и др.) готовят водные экстракты. Для этого пленки грибов снимают с поверхности агара, освобождают от него, измельчают, помещают в пробирку и заливают дистиллированной или стерильной водопроводной водой в соотношении 1:1, встряхивают и оставляют при температуре 4-10°C на 24 ч.

Задание 1. Заполните таблицу 7.

Таблица 7.

Методы определения токсичности кормов

№ п/п	Название метода токсичности кормов	Описание метода
1.		

Контрольные вопросы

1. Как устанавливают видовую и родовую принадлежность грибов?
2. Расскажите про метод непосредственного посева
3. В каких случаях применяют метод разделения грибов из первичных посевов?
4. На что обращают внимание при проведении макроскопического изучения колоний грибов?
5. Как готовят препараты для детального изучения морфологии гриба?
6. Каким образом определяют токсичность грибов?

Тема 4. Среда для культивирования парамеций (*Paramecium caudatum*)

Цель занятия: изучить различные питательные среды для культивирования парамеций.

Сенной настой. Нарезанное кусочками сено (без цветов) или солому помещают в колбу, заливают водопроводной водой в соотношения 1: 2 по объему, закрывают ватной пробкой и кипятят в течение 20 мин. Затем колбу помещают в термостат 37°C на 3 суток для накопления в среде сенной палочки (*Bac. subtilis*), которая служит кормом для парамеций. После этого в полученную среду помещают каплю с парамециями. Культивируют парамеции при комнатной температуре, периодически (1 раз в месяц) пересевают их в новую среду.

Молочная среда. Кипяченую воду оставляют на одни сутки для насыщения кислородом: на каждые 15-20 мл добавляют 2-3 капли сырого снятого молока. Для накопления молочнокислых бактерий, которыми питаются парамеции, пробирки или колбы с молочной средой помещают на 3 суток в термостат (37°C), после чего в готовую среду помещают парамеции; 3-4 раза в месяц в среду добавляют молоко. Примечания: 1) культуру с парамециями необходимо постоянно

контролировать для предупреждения загрязнения ее другими простейшими; 2) посуда, в которой культивируют парамеции, а также предметные стекла и пипетки должны быть химически чистыми; 3) вода, используемая для приготовления экстрактов, должна иметь нейтральную реакцию и не содержать посторонних примесей. Нельзя применять физиологический раствор, так как парамеции чувствительны к соли.

Метод применяют для ориентировочного определения токсичности грибов, в первую очередь таких, как *Stachybotrys alternant*, *Dendrodochium*, виды рода *Fusarium*, он дает возможность выявлять водорастворимые токсические вещества. Две капли экстракта из культуры гриба наносят на предметное или часовое стекло и добавляют одну каплю среды с парамециями. Все 3 капли должны быть одинаковыми по объему, поэтому их наносят градуированной пипеткой. Предметное или часовое стекло помещают в чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой. Критерием для определения чувствительности служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели парамеций. Гибель парамеции определяют по прекращению их движения и наличию распада. Для быстрого определения токсичности грибов, таких как *Stachybotrys alternans*, *Fusarium sporotrichiella*, *Dendrodochium*, берут кусочек колонии гриба, выросшего в чашке Петри при первичном посеве корма, переносят на предметное стекло, шпателем или петлей измельчают, заливают несколькими каплями дистиллированной воды и смешивают.

Через два часа пленку гриба удаляют или отодвигают в сторону и вносят каплю среды с простейшими и ведут наблюдение. Многие метаболиты с острой токсичностью вызывают гибель простейших в период от 1 до 20-30 мин; со слабой - до 1-2 ч, иногда несколько дольше. Определение токсичности культур грибов методом кожной пробы на кролике. В матрицы емкостью 1,5 л или конические колбы на 1000 мл помещают 200 г раздробленного зерна (кукуруза, рис, ячмень, пшеница и др.) или 30-50 г грубого корма, увлажняют водой (к зерну добавляют 100 мл для культивирования *Aspergillus* и *Fusarium* и 200 мл для *Penicillium*; к грубому корму - 20 мл) и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 кгс/см² течение 30 мин. Приготовленную среду засевают суспензией спор испытуемого гриба, предварительно выделенного в чистую культуру из первичного посева. Суспензию получают путем добавления в пробирку с культурой 3-5 мл физиологического раствора, содержащего 0,1% твина-80, ОП-7 или ОП-10, и встряхивая ее для определения спор. Колбы с посевами тщательно встряхивают. Культивируют грибы при температуре 25-27°C в течение 10 дней. Для накопления митотоксинов грибами из рода *Fusarium* (Т-2 токсин, Ф-2 токсин) культуры дополнительно выдерживают при пониженной температуре (5-7) 15-30 суток. Накопление токсических веществ в среде идет параллельно с ростом и развитием грибов. По окончании сроков культивирования культуру извлекают из сосудов, помещают в пакеты из фильтровальной бумаги и подсушивают при температуре 40-45°C,

после чего измельчают. Кожную пробу на кролике ставят и учитывают так же, как при определении токсичности кормов. Можно применять упрощенный способ определения токсичности чистых культур грибов методом кожной пробы на кролике. Для этого снимают мицелиальную пленку гриба, выросшего на питательной среде, растирают до кашицеобразного состояния и стеклянной палочкой или шпателем наносят на кожу кролика. Работу с культурами грибов проводят с соблюдением режима микробиологической лаборатории и мер индивидуальной безопасности.

Задание 1. Укажите в таблице 8 название сред, их состав и виды микроорганизмов, растущих в этой среде.

Таблица 8.

Среды для культивирования парамеций

№ п/п	Название сред для культивирования парамеций	Состав среды	Виды микроорганизмов, растущих на этой среде (латинское название)
1.			

Контрольные вопросы

1. Как происходит культивирование парамеций в сенном настое?
2. Расскажите про культивирование парамеций в молочной среде.
3. Сущность быстрого определения токсичности грибов видов *Stachybotrys alternans*, *Fusarium sporotrichiella*, *Dendrodochium*?

Тема 5. Взятие средней пробы сена для лабораторного анализа

Цель занятия: изучить и освоить методику по взятию средней пробы для лабораторного анализа.

После органолептического исследования сена или соломы на месте хранения отбирают среднюю пробу для лабораторного анализа. Средняя проба весом не менее 5 кг берется из каждых 25 тонн прессованного сена. Средняя проба состоит из отдельных пучков по 200-250 г из мест разных точек скирды. Сено перемешивают и этой пробы отбирают 300 г, помещают в стеклянную банку и отправляют в лабораторию для определения влажности. Затем отбирают сено в размере 2 кг для нижеследующего анализа.

Лабораторный анализ сена. 1. Степень влажности сена для более точных результатов может быть определено высушиваем навески сена в сушильном шкафу при температуре 110°C. 2. Определение трухи в сене. Труху, прошедшую через сито с отверстием 3 мм, взвешивают и выражают в %. Для сена первого класса - ее должно быть не более 2%, для 2 и 3 класса - не более 3%. Если трухи в сене от 3 до 10%, то сено неклассное. Сено, содержащее труху больше 10% - брак.

3. Определение наличия в сене спорыньи, головни и ржавчины. Степень влажности сена для более точных результатов может быть определено

высушиваем навески сена в сушильном шкафу при температуре 110° С. Определение трухи в сене. Труху, прошедшую через сито с отверстием 3 мм, взвешивают и выражают в %. Для сена первого класса - ее должно быть не более 2%, для 2 и 3 класса - не более 3%. Если трухи в сене от 3 до 10%, то сено неклассное. Сено, содержащее труху больше 10% - брак.

Задание 1. Заполните таблицу 9 (14 показателей).

Таблица 9.

Определение наличия в сене спорыньи, головни и ржавчины

№ п/п	Показатели	Категории соломы		
		доброкачественная	подозрительная	непригодная
1.				

Контрольные вопросы

1. Какой следующий этап проводят после органолептического исследования сена или соломы?
2. Расскажите про лабораторный анализ сена.

Тема 6. Санитарно-гигиеническая оценка корнеклубнеплодов

Цель занятия: изучить санитарно-гигиеническую оценку корнеклубнеплодов. При санитарно-гигиенической оценке корнеклубнеплодов обращают внимание на степень их механической поврежденности, загрязненности земель, пораженности гнилью, плесенью, а также следует исключить возможность наличия на их поверхности яиц различных гельминтов, паразитирующих в организме животных в слабой степени. Используют в корм животным в сыром виде до 50% от суточной нормы корнеклубнеплодов.

6.1. Определение соланина в картофеле

Материалы и методы: картофель, фарфоровые чашки, серная кислота, 50%-ный р-р перекись водорода, уксусная кислота,

Ход работы: у клубня картофеля производят срезы толщиной 1 мм, около глазков и боков. Срезы помещают в фарфоровые чашечки и наносят по 2-3 капли уксусной кислоты (60-90%-ной), концентрированной серной кислоты и 50%-ного раствора перекиси водорода. Быстро появляющееся интенсивное темно-малиновое или красное окрашивание указывает на наличие соланина на срезах картофеля. В кормовой и сахарной свекле иногда содержится большое количество ядовитых соединений - нитратов, которые могут оказывать отрицательное влияние на животных. В загнивших же ботве и корнях свеклы накапливаются нитриты (до 1,5 % в сухом веществе), вызывающие острые отравления животных.

Контрольные вопросы

1. Расскажите про метод смыва спор?

2. Для выделения каких грибов из грубых кормов применяют влажные камеры?
3. Как проводят культивирование посевов? Как осуществляют выделение чистых культур грибов из первичных посевов?
4. Какие среды применяют для культивирования парамеций (*Paramecium caudatum*)?
5. Как осуществляется взятие средней пробы сена для лабораторного анализа?
6. Как проводится лабораторный анализ сена?
7. На что обращают внимание при санитарно-гигиенической оценке корнеклубнеплодов? Как проводят определение соланина в картофеле?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11.
ОСНОВНЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА КОРМОВ.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
ЗЕРНА. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИЛОСА.
ЗНАКОМСТВО С МИКРОФЛОРОЙ КВАШЕННЫХ ОВОЩЕЙ

Тема 1. Основные микробиологические методы определения качества кормов. Выделение и учет молочнокислых бактерий.

Цель занятия: ознакомить студентов с основными микробиологическими методами определения качества кормов; элективными питательными средами №1 и №2; основными биологическими свойствами молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование: Рабочее место бактериолога, микроскопы, лупы, питательные среды №1 и №2 – по 2 чашки Петри. Тест-культуры молочнокислых микроорганизмов на плотной среде – *Lactobacterium plantarum*. Таблицы с рисунками молочнокислых бактерий. Термостат. Исследуемый корм (образцы силоса или сенажа). Гомогенизатор. Весы до 1 кг, разновесы. Стерильные чашки Петри – 2 шт. Стерильная водопроводная вода в 0,5 л флаконе. Пипетки 1,0; 5,0; 10,0 мл. Колбы 50,0; 100,0 мл. Бактериологические петли. Спиртовки.

Ход работы. Методика выявления и учета молочнокислых бактерий.

1. Подготовка исследуемого материала к анализу. Среднюю пробу (весом 0,5-1,0 кг) исследуемого материала (силоса или сенажа) тщательно перемешивают (с соблюдением основных правил асептики) и измельчают на кусочки длиной 1-2 см. Затем навеску (50 г) хорошо перемешанной средней пробы помещают в стерильный гомогенизатор марки типа M.S.E. Ato-mix, добавляют 450 мл стерильной водопроводной воды и в течение 1 минуты гомогенизируют. Полученную суспензию разбавляют до 105-106 раз стерильной водопроводной водой (5 мл суспензии + 45 мл воды), взбалтывают каждое разведение в течение 5 минут. 2. Высев суспензии на элективные среды проводится по 1 мл суспензии –

при глубинном посеве, по 0,05-0,1 мл суспензии при посеве в жидкие среды. 3. Определение количества молочнокислых бактерий проводят на капустном агаре с мелом (среда № 1) и на капустном агаре со спиртом и мелом (среда № 2) – глубинный посев. Подсчет колоний молочнокислых бактерий на капустном агаре с мелом проводится на 5-6 день, а на капустном агаре со спиртом и мелом – на 7-10 день (при 28° С). Среда 2 необходима для выявления молочнокислых бактерий в составе эпифитной микрофлоры и свежих (с высоким содержанием сухого вещества) силосов, так как спирт заметно тормозит рост посторонней микрофлоры. Посевы ставят в термостат при 28°С на 5-10 суток. 4. Количество посторонней микрофлоры (аэробных гнилостных микроорганизмов) определяют глубинным посевом на пептонном агаре (среда 3). Подсчет колоний ведется на 5-7 день (при 28° С). 5. Количество спор аэробных гнилостных бацилл на специальной среде (мясопептонный агар + сусло-агар) – среда 8. Посев поверхностный (0,05мл), подсчет колоний ведут на 4 день (при 28° С). 6. Количество микроскопических грибов и дрожжей определяют на сусло-агаре со стрептомицином (среда 4) поверхностным посевом (0,1 мл). Подсчет колоний ведут на 3-4 день (при необходимости повторно на 7-8 день) при 28° С.

7. Титр маслянокислых бактерий устанавливают на жидкой картофельной среде (среда 5). Для определения количества спор маслянокислых бактерий проводят посев из суспензии после пастеризации в течение 10 минут при 75° С. Учет результатов анализа ведут по интенсивности и выделения газа (кусочки картофеля всплывают на поверхность жидкости), титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают по методу предельных разведений. 8. Анаэробные протеолитические бактерии определяют на мясо-пептонном бульоне (среда 6) по выделению газа в поплавках. Посевы выдерживаются при 28° С в течение двух недель. 9. Денитрифицирующие бактерии учитывают на среде Гильтая (среда 7) при анализе корма из трав, выращенных по фону высоких доз азотных удобрений. Подсчет ведется по интенсивности выделения газа и посевы выдерживают в течение 10-12 дней (при 28° С).

Задание 1. Зарисуйте в тетрадь вид *Lactobacterium plantarum*, напишите морфологию и культуральные свойства.

Задание 2. Распишите состав среды № 1 и среды № 2.

Контрольные вопросы

1. Какая микрофлора называется эпифитной?
2. Какие микроорганизмы относят к молочнокислым? Какова их роль при силосовании?
3. Методы выделения и учета молочнокислых бактерий.
4. Для чего необходимы среды № 1 и № 2?

Тема 2. Исследование эпифитных микроорганизмов зерна

Цель занятия: изучить и провести исследование эпифитных микроорганизмов зерна.

На поверхности зерна обитает разнообразная микрофлора. Часть микроорганизмов попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на всей поверхности растений, развиваются лишь некоторые микроорганизмы, так называемые эпифиты. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы (греч. *phyllo* - лист). Они являются составной частью естественной флоры растения и не паразитируют на нем, а растут за счет выделений достаточно развитой его поверхности. Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности.

Среди эпифитов на поверхности листа растения обнаруживаются патогенные организмы, вступающие в особенные отношения с растением. Нередко отмечается способность грибов секретировать специфические антибиотики, подавляющие рост бактерий и других видов грибов. К тому же большинство грибов обладает способностью растворять восковой слой. Патогенные грибы обычно располагаются в складках и бороздках воскового эпикутикулярного покрова, и большая часть жизненного цикла некоторых грибов (аскомицеты - *Vizella*) проходит внутри толстой кутикулы растения-хозяина. На поверхности семян распространяется эпифитная микрофлора, называемая микроорганизмами спермосферы.

Кожура большинства семян образована клетками с жесткими, вторично утолщенными водонепроницаемыми стенками, инкрустированными танинами. Сильно загрязняется зерно во время уборки, обмолота и хранения. Степень обсеменения различного зерна микроорганизмами неодинакова и зависит от особенностей растения, условия созревания, морфологических признаков семян и т.д. Численность эпифитной микрофлоры семян может составлять от сотен до миллионов клеток на 1 г зерна. Численность этих микроорганизмов невелика, и видовой состав их довольно постоянен: более 90% составляют гнилостные бактерии, в основном - неспорозные (род *Pseudomonas*). Особенно часто на зерне встречается *Erwinia herbicola*, образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного. Количество грибов обычно колеблется в пределах нескольких тысяч на 1 г зерна.

При хранении зерна количество грибов уменьшается. Актиномицеты не являются существенным компонентом микрофлоры зерна. В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказываться отрицательно. На

развитие микроорганизмов на зерне, а, следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае пребывают в состоянии анабиоза (покоя).

На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются и тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических процессов на хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению его температуры. Это явление получило название термогенез. Самонагревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственные зерну эпифитные микроорганизмы исчезают. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*. Позднее появляются терmostойкие (термотолерантные) микрококки, на плотных срезах чаще всего образующие мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самонагревание свыше 40-50°C способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий. По мере самонагревания изменяется видовой состав и плесневых грибов: виды *Penicillium*, преобладающие вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самонагреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Erwinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хорошего качества. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Материалы и методы: стеклянная градуированная пипетка с грушей, мерный цилиндр, зерно, песок, колбы, весы.

Растворы и реактивы: стерильная водопроводная вода, МПА,

Ход работы: Навеску зерна массой 5 г поместить в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2-3 г песка. Колбу взболтать в течение 10 мин. Из полученной вытяжки приготовить разведения (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). По 1 мл суспензии каждого разведения помещают в стерильные чашки Петри на мясопептонный агар (МПА). Через 3-5 дней инкубации при 30 °C подсчитать общее число колоний в чашке Петри и рассчитать количество микроорганизмов на 1 г зерна. Из колоний приготовить препараты и под микроскопом выявить доминирующие микроорганизмы.

На основании микробиологического анализа сделать выводы о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии, встречаются *Pseudomonas Auorescens*, формирующие желтовато-зеленые флуоресцирующие колонии. Дрожжи - блестящие, выпуклые, окрашенные в розовые тона колонии. На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola*,

Pseudomonas auorescens не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие и неспорообразующие палочки.

Задание 1. Зарисуйте в тетради четырех представителей эпифитной микрофлоры, запишите морфологию и укажите их на латыни.

Контрольные вопросы

1. Где происходит размножение эпифитной микрофлоры?
2. Назовите микроорганизмы обитающих на зерне
3. Расскажите про самонагревание зерна и смену микрофлоры
4. Как проводят исследование эпифитных микроорганизмов зерна?

Тема 3. Микробиологический анализ силоса

Цель занятия: изучить методику микробиологического анализа силоса.

В основе созревания силоса лежат микробиологические процессы. Одни из этих процессов (как, например, молочнокислое брожение) являются причиной созревания и консервирования силоса, тогда как другие (маслянокислое брожение, гниение) вызывают порчу корма.

Оценка качества силоса производится по органолептическим, химическим и микробиологическим показателям.

Для контроля за ходом силосования пробы рекомендуется брать в три срока: 1) в момент закладки силосуемой массы (на количественный и качественный состав эпифитной микрофлоры); 2) после созревания силоса (на 10- 30 -ый день после закладки); 3) в момент вскрытия силосного сооружения. В связи с тем, что в разных слоях силосной массы создаются неодинаковые условия для развития микрофлоры, из крупных силосных сооружений (башни, ямы или траншеи) берут не менее трех проб по вертикали: из верхней, центральной и нижней частей.

Из подозрительных участков стога или из кормушек забирают остатки корма (100 200 г), упаковывают их в два-три слоя чистой бумаги, этикетировывают и направляют в лабораторию. Исследование грубых кормов начинают с определения его ботанического состава, затем описывают органолептические свойства (цвет корма, наличие налетов, расположение налетов и их окраску и т.д.) и только потом проводят полный бактериологический анализ. Растительные корма богаты разнообразной бактериальной и грибковой микрофлорой (количество бактерий в 1 г различных растений доходит до 100000 клеток).

Однако высокая обсемененность корма сама по себе без учета качественного состава микрофлоры не решает вопроса о его непригодности для вскармливания. Так, например, большая обсемененность травы и свежего сена псевдомонадами или молочнокислыми кокками и палочками является хорошим показателем.

Тогда как высокая обсемененность корма бактериями группы *E.coli* или анаэробными бациллами *Clostridium perfringens* ввиду их потенциальной патогенности является неблагоприятным санитарным показателем.

3.1. Органолептическая оценка силоса

При органолептическом исследовании обращают внимание на физические свойства силоса: структуру, цвет, запах и вкус силосующейся массы. Хороший силос отличается сохранением структур стеблей и листьев. Цвет их под влиянием органических кислот несколько изменяется до желто-оливкового. На воздухе силос быстро темнеет, поэтому определение цвета его следует производить сразу после взятия пробы из силосной массы.

Если корм приобрел очень темный цвет, почти черный и стал бесструктурным, это указывает на процессы гниения; такой корм – недоброкачественный. Запах доброкачественного силоса приятный, напоминающий запах свежего ржаного хлеба, квашеной капусты, соленых огурцов или моченых яблок, иногда слегка спиртовой. Последний обуславливается развитием молочнокислых бактерий и дрожжей. Резко кислый запах указывает на большое содержание уксусной кислоты, что свидетельствует о более низком качестве силоса.

Затхлый и гнилостный запах указывает на обильное развитие в силосе плесеней и гнилостных бактерий, вызывающих порчу корма. Неприятный запах придает силосу масляная кислота, образующаяся в результате неправильно проведенного силосования и указывающая на недоброкачественность силоса.

3.2. Определение кислотности силоса

Наиболее ярким показателем микробиологических процессов, протекающих в силосе, является его рН. Определение производится ионометром или колOMETрическим методом по Михаэльсу.

Материалы и методы: дистиллированная вода, фарфоровая ступка, колба, бумажный фильтр, индикаторные полоски для определения рН.

Ход работы: Для этой цели из силоса готовят вытяжку или путем настаивания в течение суток одной части силоса с 4-5 частями дистиллированной воды (для прекращения брожения обычно добавляют толуол), или эту навеску силоса (20 г) предварительно растирают в фарфоровой ступке, переносят в колбочку, а затем заливают дистиллированной водой (80 мл). Силос с водой энергично взбалтывают (в первом случае 4-5 раз, во втором – в течение 5 минут), фильтруют через бумажный фильтр и прозрачный фильтрат сразу используют для определения рН. В доброкачественном силосе рН должно быть не выше 4.0-4.2.

3.3. Микробиологическое исследование силоса

Для общего ознакомления с микрофлорой силоса производят его микроскопическое исследование. Для этой цели небольшое количество силоса (12

г) тщательно растирают в стерильной ступке с 1-2 мл стерильной воды и из полученной массы делают обычным способом мазок. Мазок сушат, фиксируют на пламени спиртовки и окрашивают водным раствором какого-нибудь анилинового красителя. Лучше всего окрашивать мазки из силоса карболовым эритрозином (5%-ный раствор карболовой кислоты 100 мл, сухого эритрозина 2 г); окраска производится в течение 20-30 минут. Обычно в мазках, приготовленных из доброкачественного силоса, обнаруживается большое количество палочек, стрептококки, дрожжи. Наличие в препарате плесневых грибков указывает на порчу силоса. Для характеристики качества силоса производят определение общего числа микроорганизмов и их групповой учет.

При этом прежде всего готовят разведение силоса (5 г) и переносят его в колбу со 100 мл стерильной воды. Силос с водой энергично взбалтывают в течение 10 минут и из полученного исходного разведения 1:10 готовят последующие разведения. Для приготовления разведения берут 6-7 пробирок, в которые предварительно наливают по 9 мл стерильной воды. Затем в первую из них пипеткой вносят 1 мл разведения силоса 1:10 (из колбы), тщательно взбалтывают в течение 3-5 мин. и 1 мл полученного разведения 1:100 переносят в следующую пробирку и т.д. Таким образом готовят последующие разведения до 10^{-6} 10^{-7} .

Растворы и реактивы: стерильная вода, среда МПА, суслоагар с мелом, анилиновый краситель (карболовый эритрозин).

Материалы и методы: силос, ступка, градуированная пипетка, термостат, спиртовка, покровные и предметные стекла,

Ход работы: Определение в силосе общего количества бактерий для этого посев суспензии производят на МПА, в двухкратной повторности. Если силос находится в стадии брожения, для посева берут разведения 10^{-6} 10^{-7} , при исследовании старого силоса 10^{-6} 10^{-5} и даже меньше. Посев производят следующим образом: стерильной градуированной пипеткой асептично берут 1 мл соответствующего разведения (для каждого разведения нужна отдельная пипетка) и вносят в пустую чашку Петри. Затем в чашку наливают предварительно расплавленный и охлажденный до 50°C мясо-пептонный агар.

Учет молочнокислых бактерий. Производят путем посева 3-4 разведений силосной массы на суслоагаре с мелом (сусло-агар готовят из пива, разведенного водой 1:1 с добавлением 1.5-2%-ного агар-агара). Посевы выдерживают 3-4 дня в термостате при температуре 30-35 °С. Вследствие образования кислоты и растворения мела колонии молочнокислых микробов образуют на твердых средах с мелом зоны просветления.

3.4. Определение количества маслянокислых бактерий

Растворы и реактивы: водопроводная вода 100 мл, 5.0 мел, картофельная среда Рушмана или среда Е.Н. Мишустина.

Материалы и методы: силос, пробирки с поплавками, термостат.

Ход работы: Производят путем посева 3-4 разведений силоса на картофельную среду Рушмана или на среду Е. Н. Мишустина следующего состава: крахмал 0.5 г; пептон 5.0 г; K_2HPO_4 1.0 г; мел 5.0 г; водопроводная вода 1000 мл. Среда разливается по пробиркам с поплавками и стерилизуется в автоклаве при 1 атмосфере 20 минут. Различные разведения силосной массы (от 1:100 до 1:10 000) засевают в пробирки с питательной средой в количестве 1 мл (каждое разведение засевают параллельно в 2-3 пробирки). Часть из них после посева прогревают при температуре $80^{\circ}C$ в течение 10-15 минут, а затем засеянные пробирки выдерживают в термостате при температуре $35-40^{\circ}C$ до 10 суток. В процессе роста маслянокислых бактерий отмечают газообразование, гидролиз, растворение мела и запах прогорклого масла.

Задание 1. Зарисуйте и запишите в тетради латинское название, морфологию, культуральные свойства трех представителей микроорганизмов, участвующих в порче силоса.

Контрольные вопросы

1. Какие микробиологические процессы лежат в основе созревания силоса?
2. Расскажите про органолептическую оценку силоса.
3. Каким образом определяют кислотность силоса?
4. Как проводят микробиологическое исследование силоса?
5. Суть определения количества маслянокислых бактерий

Тема 4. Знакомство с микрофлорой квашеных овощей

Цель занятия: ознакомится с микрофлорой квашенных овощей, правилами взятия проб для исследования.

Молочнокислое брожение при квашении плодов и овощей возникает самопроизвольно (спонтанно) в результате деятельности молочнокислых бактерий, находящихся на растительном сырье. Чтобы они получили доступ к находящемуся в клетках плодов и овощей сахаристому соку, капусту размельчают, пересыпают солью (2-3%) плотно укладывают в емкости и оставляют под давлением. В начальной стадии процесса квашения капусты развиваются различные бактерии, дрожжи, которые продуцируют кислоты - молочную, уксусную, а также CO_2 , спирт. Затем благодаря CO_2 создаются анаэробные условия для преимущественного развития молочнокислых бактерий.

В первую очередь развиваются гетероферментативные молочнокислые бактерии - *Leuconostoc*, на смену им приходят палочковидные *Lactobacillus plantarum* (гомоферментативная, мезофильная) и гетероферментативная *L. brevis*, дрожжи. *L. brevis* может привести к излишней кислотности. Скорость сквашивания капусты зависит от температуры.

Оптимальной является температура 20-25°C, при которой брожение протекает обычно 6-8 суток. Образующаяся молочная кислота (1,5-2,0%) оказывает консервирующее действие, а вещества побочных реакций придают продукту характерные органолептические свойства. Фаза дрожжей и плесневых грибов - снижается кислотность в результате развития грибной флоры (*Oidium lactis*). В результате снова возникает возможность развития гнилостных видов. Продукт портится.

4.1. Микрофлора квашеной капусты

В начале процесса сквашивания капусты развиваются аэробные микроорганизмы – бактерии и дрожжи, занесенные с сырьем. Они образуют небольшие количества кислот – уксусной, муравьиной, молочной, а также спирт и CO₂. Постепенно создаются анаэробные условия, благоприятствующие развитию молочнокислых бактерий. Сначала развивается гетероферментативная молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides* (лейконосток), образующая эфиры, придающие заквашенному продукту характерный запах.

Лейконосток сменяют палочковидные молочнокислые бактерии, например, гомоферментативная мезофильная бактерия *Lactobacillus plantarum*, которой принадлежит основная роль в процессе квашения капусты.

Развиваются и гетероферментативные бактерии, в частности, кислотоустойчивая бактерия *Lactobacillus brevis*, а также дрожжи, вызывающие спиртовое брожение. Количество клеток микроорганизмов в этот период сквашивания в 1 мл достигает нескольких миллионов. Чрезмерное развитие *Lactobacillus brevis* может привести к порче – излишней кислотности капусты, приобретению ею острого привкуса. Также качество капусты снижается и при интенсивном развитии дрожжей.

Порчу квашеной капусты вызывают гнилостные и маслянокислые бактерии, которые придают прогорклый вкус, резкий, неприятный запах. Спорообразующие бактерии, обладающие пектолитическими ферментами, вызывают размягчение (дряблость) капусты, появление неприятного запаха и вкуса. Размягчение капусты также возникает и под действием собственных ферментов.

4.2. Микроскопическое исследование квашеной капусты

Растворы и реактивы: стерильная дистиллированная вода, МПА, Сусло-агар (СА), Сусло-агар с мелом (САМ), среда на молоке, картофельная среда Рушмана, эритрозин.

Материалы и оборудование: капуста квашенная, фарфоровая ступка и пестик, предметные и покровные стекла, микроскоп, стерильные банки с притертыми пробками, колбы, пробирки, чашки Петри, термостат.

Ход работы: В фарфоровой ступке (с небольшим количеством стерильной дистиллированной воды) растирают кусочек капусты. Из растертой массы на предметном стекле пестиком делают мазок, затем его фиксируют и окрашивают

эритрозином. Мазок рассматривают под иммерсионной системой и зарисовывают. В хорошем продукте встречаются единичные палочки и кокки, в плохом – обнаруживается большое количество кокков и палочек.

Микробиологическое исследование проводят для выявления разных физиологических групп микроорганизмов: молочнокислых, маслянокислых, гнилостных, газообразующих, дрожжей и плесеней. Перед посевом готовят разведения. С этой целью на технических весах отвешивают 40 г капусты. Навески с соблюдением правил стерильности переносят в стерильные банки с притертыми пробками, в которые налито 360 мл стерильной воды. Чтобы «отмыть» микроорганизмы, содержащиеся на поверхности растений, капусту и взбалтывают в течение 10 мин на шуттель-аппарате или руками. В банках получается разведение 1:10.

Приготовить колбы со стерильной водой по 90 мл в каждой и пронумеровать: 2, 3, 4, 5, 6, 7. Последующие разведения готовят путем внесения 10 мл разведения 1:10 во вторую колбу с 90 мл стерильной воды, в результате чего получается разведение 1:100. Из второй колбы 10 мл разведения 1:100 переносят в третью колбу, получается разведение 1:1000 и т.д. Содержимое колбы перед взятием разведения взбалтывают в течение 3 мин. после приготовления разведений готовят посуду (чашки Петри, пробирки), питательные среды, делают надписи. Физиологические группы микроорганизмов определяют на следующих питательных средах: Мясо-пептонный агар (МПА) – гнилостную микрофлору; Сусло-агар (СА) - плесени и дрожжи; Сусло-агар с мелом (САМ) молочнокислые бактерии; Молоке – молочнокислые бактерии; Лактозе – газообразующие (кишечные) бактерии; Картофельной среде Рушмана – маслянокислые бациллы.

В приготовленную посуду и среды, начиная с последней колбы, вносят по 1 мл разведения: на МПА с 1, 2, 3, 4, 5 разведениями; на СА с 1, 2, 3, 4; на САМ со 2, 3, 4, 5, 6, 7; на молоко со 2, 3, 4, 5, 6, 7; на сусло пивное со 2, 3, 4, 5, 6, 7; на лактозу с 1, 2, 3, 4, 5; на картофельную среду Рушмана с 1, 2, 3, 4, 5 разведениями. После приготовления питательных сред в соответствии с методикой и охлаждения питательных сред до 50-45°C (а САМ и после тщательного взбалтывания), их вносят в чашки Петри с внесенными разведениями.

Легкими вращательными движениями чашек смешивают разведения со средой и оставляют на ровной поверхности для застывания. Чашки Петри переворачивают вверх дном ставят в термостат и выдерживают при температуре 30-35° С в течение трех суток.

На четвертые сутки проводят учет физиологических групп микроорганизмов. Численность микроорганизмов на плотных питательных средах определяют путем подсчета колоний, на жидких питательных средах – путем обнаружения роста микробов из разных разведений, а на молоке – по его свертыванию.

Та из свернувшихся сред, в которую было внесено наибольшее разведение, и будет определять количество молочнокислых микроорганизмов в квашеных

овошах и силосе. На плотных средах в чашках Петри подсчет ведут из трех разведений, в каждом из которых выросло не менее десяти колоний.

Задание 1. Зарисуйте и напишите латинское название, морфологию и культуральные свойства микроорганизмов участвующих при квашении овощей и силоса.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы принимают участие в квашении овощей, какова их роль?
2. Опишите микрофлору квашенной капусты. Как проводят микроскопическое исследование квашенной капусты
3. На каких питательных средах определяют физиологические группы микроорганизмов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЛОКА, СЫРА, КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Цель занятия: изучить и освоить методику проведения микробиологического анализа молока, сыра, кисломолочных продуктов.

Микробиологическое исследование молока проводят в следующих случаях:

1) когда возникает подозрение, что оно может представлять опасность для здоровья людей; 2) в порядке контроля за санитарно-гигиеническим режимом доения и первичной обработки хранения и транспортировки; 3) в случае подозрения на обсемененность микроорганизмами, при наличии которых молоко не может перерабатываться в молочные продукты; 4) для установления микрофлоры, вызвавшей воспаление молочной железы и ее антибиотикоустойчивости. В большинстве случаев микробиологическое исследование молока ограничивается определением общего количества бактерии и бродильного титра.

Тема 1. Групповой и количественный учет микроорганизмов в сыром молоке

Цель занятия: научиться проводить групповой и количественный учет микроорганизмов в сыром молоке.

В целях детального исследования микрофлоры сырого молока проводят определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в молоке. При этом для учета отдельных групп микроорганизмов используют различные элективные питательные среды или особые условия культивирования.

1.1. Количественный учет молочнокислых бактерий.

Растворы и реактивы: молоко, агар с гидролизованным молоком, мел измельченный.

Материалы и оборудование: чашки Петри, термостат, градуированная пипетки с грушей.

Ход работы. При определении молочнокислых бактерий сеют разведения сырого молока в чашки Петри. Перед тем, как залить чашку агаром с гидролизованным молоком, расплавленным и остуженным заранее до 45-50° С на дно засыпают 0,5 г измельченного мела. Агар застывает, чашку Петри переворачивают вверх дном и помещают в термостат с температурой 35° С. Через 36-48 часов выдержки, считают количество молочнокислых бактерий по зонам просветления вокруг них, которые появляются за счет образования растворимого лактата кальция.

1.2. Количественный учет протеолитических бактерий

Метод определения протеолитических бактерий основан на их способности расщеплять белки под действием протеолитических ферментов.

Растворы и реактивы: молоко, молочный агар.

Материалы и оборудование: чашки Петри, термостат, градуированная пипетка с грушей.

Ход работы: Чтобы определить количество протеолитических бактерий сеют по 1 см³ разведений молока в заранее стерилизованные чашки Петри. Затем в них наливают расплавленный и остуженный до 45-50°С молочный агар. Агар застывает, чашку Петри помещают в термостат с температурой 30°С. Через 36-48 часов выдержки, считают количество протеолитических бактерий по зонам просветления вокруг них, образующихся вследствие разложения молочного белка.

Наиболее распространенные протеолитические бактерии: псевдомонады, палочки протей, большинство спорообразующих бактерий.

1.3. Количественный учет маслянокислых бактерий

Растворы и реактивы: пробирки со стерильным молоком и парафином,

Материалы и оборудование: градуированные стеклянные пипетки с грушей, водяная баня, термостат.

Ход работы: Высевают разведения исследуемого продукта в пробирки со стерильным молоком и парафином. Затем пробирки помещают в водяную баню и нагревают до температуры 85°С в течение 10 мин. После этого их остужают до 30°С и ставят в термостат при температуре 30°С на 3 суток. Три признака, по которым можно определить наличие маслянокислых бактерий: 1) образование газа; 2) запах масляной кислоты; 3) присутствие в микроскопическом препарате спорообразующих бактерий, которые имеют форму барабанных палочек и дают положительную реакцию на гранулезу. Для определения гранулезы берут

предметное стекло, на него наносят каплю взвеси микроорганизмов и добавляют каплю раствора Люголя, покрывают покровным стеклом. Если в клетках содержится гранулеза, то она приобретает синий цвет. Определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в сыром молоке, приведено в таблице 10.

Задание 1. Провести количественный учет различных групп микроорганизмов в сыром молоке.

Таблица 10

Определение основных групп микроорганизмов в сыром молоке

Определяемый показатель	Метод исследования	Используемая питательная среда	Засеваемое разведение молока	Количество чашек (или пробирок)	Результат исследования
Количество бактерий: молочнокислых	Чашечный	Агар с гидролизированным молоком и мелом	4	1	
			5	1	
			6	1	
протеолитических	Чашечный	Молочный агар	2	1	
			3	1	
			4	1	
маслянокислых	Пределных разведений	Стерильное молоко с добавлением парафина	1	2	
			2	2	
			3	2	
			4	2	
липолитических	Чашечный	Питательный агар с говяжьим жиром	1	1	
			2	1	
			3	1	
Количество дрожжей и плесеней	Чашечный	Сусло-агар или среда Сабуро	0	1	
			1	1	
			2	1	

1.4. Количественный учет липолитических бактерий

Липолитические микроорганизмы способны разлагать жир, в результате чего появляются различные пороки вкуса и запаха молочных продуктов

Растворы и реактивы: стерильный расплавленный говяжий жир, молоко, питательный агар.

Материалы и оборудование: чашки Петри, стеклянные градуированные пипетки с грушей.

Ход работы. В чашку Петри наливают стерильный расплавленный говяжий жир и сразу сливают. Застывший жир остается на дне чашки. В эту же чашку

Петри вносят 1 см³ исследуемого разведения молока и заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50°C питательным агаром. При застывании агара чашки Петри с посевами необходимо держать при 20°C в течение 5-6 суток. Подсчитывают количество колоний липолитических микроорганизмов, вокруг которых образовались белые зоны.

Контрольные вопросы

1. В чем отличия количественного учета различных групп микроорганизмов в молоке?
2. В чем сущность количественного учета различных групп микроорганизмов в молоке?
3. Какие микроорганизмы можно обнаружить при количественном учете?

Тема 2. Определение микроструктуры сыра (по Г. Тинякову)

Цель занятия: изучить определять микроструктуру сыра.

Растворы и реактивы: 10% раствор формалина, 50% и 96% спирт, раствор судана III (реактив 32), гематоксилин (реактив 36), глицерин-желатин (реактив 37), 5% раствор азотнокислого серебра, 1% водный раствор пирогалловой кислоты, 5% раствор тиосульфата

Материалы и оборудование: холодильник, микроскоп, нож, бритва, предметное и покровное стекло

Ход работы. Вначале готовят препараты из сыра, для этого из середины сыров вырезают небольшой кубик (около 1 см³) и фиксируют его в 10% растворе формалина 12-24 ч и 2-3 раза промывают водой. Можно обойтись без фиксации, но в этом случае препараты хуже окрашиваются. На замораживающем микротоме готовят срезы с помощью бритвы сыра толщиной около 15-20 мкм. Их сразу переносят в воду. Затем срезы сыра последовательно опускают на 2 мин в 50% спирт, на 10-15 мин в раствор судана III (реактив 32) и на 10 мин в ванночку с гематоксилином (реактив 36). После этого срез ополаскивают в дистиллированной, водопроводной и снова в дистиллированной воде, помещают на предметное стекло, заливают каплей расплавленного глицерин-желатина (реактив 37) и закрывают покровным стеклом, слегка прижимая его иглой для равномерного распределения жидкости. В гематоксилине большинство белковых элементов, в частности прослойки между микрозернами, некоторые неорганические вещества окрашиваются в темно-синий цвет. Для просмотра распределения в сыре солей кальция срезы делают по Коссу из кусочков сыра, зафиксированных в 96%-ном спирте, так как соли кальция в формалине растворяются. Срезы при дневном освещении помещают на 30 мин в 5%-ный раствор азотнокислого серебра и ополаскивают в воде. На 2-3 мин срез опускают в 1%-ный водный раствор пирогалловой кислоты, ополаскивают водой, на 1 мин

погружают в 5%-ный раствор тиосульфата (не обязательно), промывают водопроводной водой и заделывают на предметном стекле в расплавленном глицерин-желатине. Препараты остаются бесцветными, только соли кальция окрашиваются в черный цвет.

Приготовленные препараты рассматривают при увеличении микроскопа в 56-80 раз (окуляр 7 или 10, объектив 8). В поле зрения микроскопа должна быть хорошо видна микроструктура зерен и вкрапленные в белковую массу микрозерна. Макрозерна тесно соприкасаются одно с другим, но между ними должны быть видны сывороточные прослойки, окрашенные гематоксилином в синий или фиолетовый цвет. При малом увеличении они имеют вид тонких нитей, а при большом (около 500 раз) четко выявляется их величина (в среднем 11 мкм). Прослойки - это белково-сывороточный материал, в нем почти нет липоидных включений. Макрозерна состоят из белков, нейтральных жиров и липоидов. Наиболее резко выделяются капли жира при обработке Суданом III, окрашивающим их в ярко-оранжевый цвет.

Светло-желтый оттенок имеют многочисленные белково-липоидные микрозерна. Микроскопические препараты рассматривают, пользуясь окулярным микрометром, вложив его в окуляр, и объектмикрометром с линейкой длиной 1 мм, разделенной на 100 частей. Следовательно, величина каждого деления линейки равна 0,01 мм. Положив объектмикрометр на столик микроскопа вместо препарата и подведя деления окулярмикрометра к делениям объектмикрометра, определяют цену каждого деления. При окуляре 7 и объективе 8 одно деление окулярмикрометра равно двум делениям объектмикрометра, поэтому одно деление окулярмикрометра равно 20 мкм. При данном окуляре и объективе устанавливают линейные размеры любой частицы зерна. На препарате измеряют короткие и длинные оси макрозерен. Вычисляют средние величины макрозерен не менее чем из десяти определений, площади макрозерен, толщину прослоек между макрозернами, микропустотки и т.д.

Задание 1. Зарисуйте в тетради микроструктуру сыра и сделайте подписи к рисунку.

Задание 2. Напишите подробно в тетради что влияет на количество микро и макрозерен.

Контрольные вопросы

1. С помощью чего определяют микроструктуру сыра?
2. Что можно обнаружить при микроскопировании сыра?
3. Что влияет на количество микро и макрозерен?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Тема 1. Определение молочнокислых микроорганизмов в ферментированных молочных продуктах, заквасках, бактериальных препаратах

Цель занятия: научиться определять молочнокислые микроорганизмы в молочных продуктах, заквасках и бактериальных препаратах.

Растворы и реактивы: агар, спирт, гидролизованное молоко, физиологический раствор, бикарбонат натрия, порошок панкреатина, хлороформ, 40%-й раствор NaOH, дистиллированная вода.

Материалы и оборудование: термостат, стерилизатор, рН-метр, весы, чашки Петри, колбы, пробирки, микробиологическая петля, горелка, электроплитка, ножницы, пипетки, водяная баня, фарфоровая ступка и пестик, бумажный фильтр.

Ход работы. Для определения наличия и подсчета количества молочнокислых бактерий в кисломолочных напитках отобранную для анализа упаковку протирают спиртом, надрезают ее край чистыми ножницами и отбирают стерильной пипеткой 1 см³ продукта. Для определения молочнокислых бактерий в твороге или сыре взвешивают с соблюдением правил стерильности 10 г продукта, переносят навеску в стерильную ступку и растирают, порциями добавляя жидкость из колбы, содержащей 90 см³ стерильного физиологического раствора. Приготовленную суспензию переносят обратно в колбу и получают исходное разведение продукта 10–1.

Для приготовления разведений сухих заквасок или бактериальных препаратов края флакона или пакета протирают спиртом, край флакона обжигают и вынимают пробку, а пакет надрезают профламбированными ножницами. Отвешивают 1 г испытываемого материала в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую стерильной крышкой от чашки Петри, тщательно растирают, добавляя небольшое количество стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера из колбы, содержащей 99 см³ раствора или буфера. Суспензированный материал переливают в колбу с оставшимся раствором и таким образом получают разведение сухой закваски или бактериального препарата 10–2. Из продуктов или их исходных разведений готовят следующие десятикратные разведения в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации. В таблице 11 приведены разведения молочных продуктов для посева на питательные среды. Для посева в агаризованную среду отбирают те разведения продукта, при посеве которых на чашках Петри вырастает от 15 до 150 колоний. Для учета молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах, заквасках и бактериальных препаратах чашечным методом в качестве питательной среды используют агар с гидролизанным молоком.

Разведения молочных продуктов для определения в них количества
молочнокислых бактерий

Наименование продукта	Разведения, используемые для посева
Кисломолочные напитки, закваски жидкие и сухие, творог, сметана, сыры	10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9}
Бактериальные препараты молочнокислых бактерий	10^{-9} ; 10^{-10} ; 10^{-11}
Сухие кисломолочные продукты	10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8}

1.2. Питательные среды для культивирования лактобактерий

1.2.1. Агар с гидролизованным молоком

Растворы и реактивы: гидролизированное молоко, агар.

Материалы и методы: ватный фильтр, колбы, пробирки, чашки Петри.

Ход работы: В 1 дм³ гидролизованного молока вносят 15 г агара. Среду нагревают до полного расплавления агара, фильтруют ее через ватный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 10 мин. Подсчет выросших колоний молочнокислых бактерий на чашках Петри и пересчет их содержания в 1 г или 1 см³ продукта проводят таким же образом, как и при определении КМАФАнМ.

Задание 1. Напишите в тетрадь методику определения молочнокислых микроорганизмов в заквасках или в бактериальных препаратах.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводят определение молочнокислых микроорганизмов в ферментированных молочных продуктах или заквасках?
2. Методика проведения молочнокислых микроорганизмов в ферментированных молочных продуктах или заквасках?
3. Какие используют питательные среды для культивирования лактобактерий.

Тема 2. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах

Цель занятия: научиться определять бифидобактерии в кисломолочных продуктах.

Растворы и реактивы: агар, 70% этиловый спирт, раствор бикарбоната натрия, физиологический раствор, среда Блаурока, кукурузно-лактозная – КЛС или гидролизатно-молочная – ГМС. Реактивы для окрашивания по Грамму (красители трифенилметановой группы: генциановый, метиловый фиолетовый или кристаллвиолет, раствор Люголя или йодистый раствор по Граму (водный

раствор йодида калия и кристаллического йода в соотношении 2:1), фуксин, этиловый спирт (96°) или ацетон).

Материалы и оборудование: термостат, стерилизатор, микроскоп, весы, чашки Петри, мерные колбы, пробирки, пипетки, микробиологическая петля, горелка, электроплитка, пипетки, водяная баня, предметное стекло.

Ход работы. Подготовка. Перед вскрытием поверхность упаковки моют, протирают и обрабатывают 70 %-м этиловым спиртом. Вскрытие упаковки производят в асептических условиях. Из упаковки после тщательного перемешивания отбирают в стерильную колбу 10 см³ исследуемого продукта и добавляют 1,0 см³ стерильного раствора бикарбоната натрия с массовой концентрацией 100 г/дм³. Все перемешивается в колбе.

К нейтрализованному образцу продукта добавляют физиологический раствор до достижения общего объема пробы 100 см³, после чего смесь опять тщательно перемешивают. Получают разведение продукта 10–1. Пипетку, которой отбирали пробу продукта, промывают до 10 раз полученной смесью до верхнего уровня имеющихся на ней делений. Из полученного первого разведения готовят последующие, используя новую стерильную пипетку для каждого разведения. Для посева используют разведения 10⁻⁵; 10⁻⁶; 10⁻⁷; 10⁻⁸. Проведение исследования. Готовят два ряда питательных сред, каждый по пять пробирок, содержащих среду Блаурока; кукурузно-лактозную – КЛС или гидролизатно-молочную – ГМС. Перед использованием среду нагревают на кипящей водяной бане для удаления, содержащегося в ней растворенного кислорода. При применении плотных питательных сред их разогревают до полного расплавления агара и затем остужают до температуры 40° С. Затем вносят посевной материал в среду с последнего разведения, внося в две последние пробирки по 1 см³ разведения 10–8. Для каждого посева используют новую стерильную пипетку. Пробирки с посевами разведений продукта выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение 72 ч, просматривая посева через 24 и 48 ч. По окончании термостатирования учитывают последние пробирки, в которых выросли колонии, типичные для бифидобактерий: в виде «гвоздиков», «вытянутых веретен», иногда в виде «полос», расположенных вдоль пробирки. В плотных средах колонии бифидобактерий выглядят в виде «дисков» или «гречишных зерен». Выросшие колонии подсчитывают. Подтверждение присутствия колоний бифидобактерий устанавливают под микроскопом. Препараты из колоний окрашивают по Граму.

Бифидобактерии грамположительны и имеют под микроскопом вид тонких, мелкозернистых, слегка изогнутых палочек с раздвоением на концах или без него; располагаются группами, скоплениями в виде китайских иероглифов, могут образовывать короткие цепочки. Содержание живых бифидобактерий в 1 см³ продукта определяют по формуле:

$$X = a \cdot 10n, \text{ где}$$

X – количество клеток живых бифидобактерий в 1 см³ продукта;

a – среднее количество колоний в последнем, засеянном в двух рядах разведении продукта;

n – показатель последнего разведения продукта, в котором отмечен рост бифидобактерий.

Задание 1. Зарисуйте в тетради и подпишите четырех представителей бифидобактерий.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводят определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах?
2. Сущность методики определения количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах?
3. Как выглядят бифидобактерии в готовых препаратах.