

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

И.В. Боев

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Лабораторный практикум
с элементами исследовательской работы*

Красноярск 2017

Рецензент

*С.В. Хижняк, доктор биол. наук, профессор кафедры
экологии и естествознания Красноярского ГАУ*

Боер, И.В.

Микробиология: лабораторный практикум с элементами исследовательской работы / И.В. Боер; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2017. – 56 с.

Лабораторный практикум содержит методические указания по выполнению 14 лабораторных работ, объединенных в 4 тематических модуля. Может быть использован аспирантами и научными сотрудниками для изучения микроорганизмов окружающей среды и процессов ими осуществляемых.

Предназначено для студентов очной и заочной форм обучения Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины, обучающихся по направлениям подготовки 36.03.02 «Зоотехния», 35.03.07 «Технология производства и переработки с.-х. продукции», 06.03.01 «Биология», студентов Института агроэкологических технологий, обучающихся по направлениям подготовки 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение», 35.03.04 «Агрономия» и студентов Института пищевых производств, обучающихся по направлениям подготовки 38.03.06 «Торговое дело», 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья».

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Красноярского государственного аграрного университета

© Боер И.В., 2017

© ФГБОУ ВО «Красноярский государственный
аграрный университет», 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории	5
МОДУЛЬ 1. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	6
Лабораторная работа №1. Оптический микроскоп. Техника приготовления препаратов микроорганизмов	6
Лабораторная работа №2. Морфология микроорганизмов-прокариот. Основные формы бактериальных клеток	8
Лабораторная работа №3. Морфология микроорганизмов-эукариот. Дрожжевые и плесневые грибы	10
Лабораторная работа №4. Сложные методы окраски. Строение микробной клетки. Запасные питательные вещества	11
МОДУЛЬ 2. ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	14
Лабораторная работа №5. Питательные среды. Методы стерилизации	14
Лабораторная работа №6. Значение отдельных питательных элементов в жизнедеятельности микроорганизмов	22
Лабораторная работа №7. Культивирование микроорганизмов. Количественный и качественный учет микроорганизмов в различных субстратах	26
Лабораторная работа №8. Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ. Изучение биотехнологии процессов брожения и неполного окисления	31
МОДУЛЬ 3. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ	39
Лабораторная работа №9. Круговорот азота и роль микроорганизмов в нем. Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота	39
Лабораторная работа №10. Участие микроорганизмов в процессах трансформации фосфора	44
Лабораторная работа №11. Микробиологический способ определения обеспеченности растений почвенным фосфором	46
МОДУЛЬ 4. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА, ПРОЦЕССОВ ПЕРЕРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ	48
Лабораторная работа №12. Микробиологическая оценка качества зерна	48
Лабораторная работа №13. Микробиологическая оценка качества силоса	50
Лабораторная работа №14. Дрожжевание кормов	52
Библиографический список	55

ВВЕДЕНИЕ

Практикум по микробиологии предназначен для самостоятельной работы студентов аграрного университета.

Он составлен на основе опыта проведения лабораторных занятий на кафедре микробиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы с основами стандартизации продуктов животноводства Красноярского государственного аграрного университета.

В практикум включены лабораторные работы, позволяющие изучить строение микроорганизмов и основные процессы, осуществляемые ими.

Изложение материала каждой лабораторной работы проводится в определенной последовательности: вначале дается краткое объяснение теоретического материала, целью которого является осмысленное выполнение лабораторной работы.

Далее приводятся конкретные задания студенту по последовательному выполнению эксперимента и оформлению результатов в тетради. В конце каждой работы даны вопросы для самостоятельного контроля.

Для лучшего выполнения лабораторных работ и освоения материала необходимо его предварительное самостоятельное изучение.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Входить в лабораторию в пальто, головном уборе, вносить посторонние вещи не разрешается. К занятиям допускаются студенты только в хлопчатобумажных халатах. Длинные волосы должны быть подобраны, во избежание их попадания в пламя спиртовки.
2. Пользоваться только своим рабочим местом и закрепленным за ним оборудованием.
3. Соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя.
4. Не допускать приема пищи и воды в помещении лаборатории, избегать излишних разговоров и ненужных переходов.
5. Строго соблюдать правила обращения с реактивами и красителями.
6. Соблюдать правила работы со спиртовкой (перед зажиганием продуть пары спирта, скопившиеся под крышкой, приподняв фитиль; не бросать горящих спичек; не зажигать спиртовку от спиртовки; не переносить зажженную спиртовку с одного места на другое).
7. Быть предельно аккуратным при работе с культурами микроорганизмов, не допускать попадания содержимого пробирки на поверхность рабочего стола, одежды и т.д. В случае нарушения целостности объема, в котором находится культура (например, при разбивании, пролипании), следует поставить в известность преподавателя и совместно с ним принять меры дезинфекции.
8. Не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов, не допускать распыления спор грибов, которые являются аллергенами.
9. Использованные инструменты, предметные и покровные стекла, пипетки и т.п. помещать в сосуд с дезинфицирующей жидкостью. Металлические предметы следует прожигать в пламени спиртовки.
10. Стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные микроорганизмами, подвергать дезинфекции.
11. По окончании работы привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки с мылом.
12. Перед уходом из лаборатории дежурный проверяет рабочие места, закрывает воду, выключает свет, электроприборы.

МОДУЛЬ 1 МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 1. Оптический микроскоп. Техника приготовления препаратов микроорганизмов

Цель работы – познакомиться со строением и правилами работы с микроскопом, овладеть техникой приготовления препаратов микроорганизмов.

Оборудование и материалы: оптические микроскопы, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовки, красители, культуры микроорганизмов.

Техника приготовления препарата «раздавленная капля»

На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды, в которую вносят бактериологической петлей небольшое количество клеток микроорганизмов.

Петлю прожигают в пламени спиртовки для уничтожения оставшихся в ней микробов. Каплю с исследуемым материалом накрывают покровным стеклом. Следует при этом обращать внимание на то, чтобы в препарате не было излишка жидкости, который удаляют фильтровальной бумагой. Препарат рассматривают под микроскопом с сухими системами объективов и с иммерсией. Препарат «раздавленная капля» используют для изучения формы клеток и их подвижности.

Техника приготовления препарата «висячая капля»

Препарат «висячая капля» готовится нанесением петлей на стерильное покровное стекло очень маленькой капли жидкости с взвешенными в ней клетками микроорганизмов.

Стекло тотчас же переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с лункой так, чтобы капелька висела над лункой, не касаясь ее краев и дна.

Края лунки предварительно смазывают смесью равных частей вазелина и жидкого парафина, и покровное стекло крепко прижимают к предметному стеклу.

Препарат просматривают с сухими системами объективов и с иммерсией. Наблюдения можно проводить длительно – в течение недели и более.

При приготовлении препаратов для длительных наблюдений пользуются не водой, а жидкой питательной средой. Препараты можно помещать на электрический нагревательный столик и следить за развитием микроорганизмов.

Техника приготовления «фиксированного» препарата

На чистое обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей наносят небольшую каплю стерильной водопроводной воды. В каплю воды помещают небольшое количество клеток микроорганизмов и равномерно размазывают по стеклу. Площадь получившегося мазка должна быть в диаметре 1,5-2 см, а сам мазок необходимо сделать тонким, равномерно распределив в нем материал.

В очень густом мазке невозможно будет изучить морфологию бактериальных клеток. Мазок высушивают на воздухе или высоко над пламенем спиртовки. Высушенный мазок должен быть прозрачным – сквозь него должен свободно просматриваться текст книги.

После высушивания приступают к фиксации мазка. Фиксация необходима для того, чтобы убить бактерии и закрепить их на поверхности предметного стекла. В противном случае мазок будет смыт при последующем окрашивании. После фиксации бактериальные клетки становятся более восприимчивыми к красителям.

Наиболее распространенным и самым простым методом фиксации является нагревание стекла с мазком в пламени спиртовки. Для этого предметное стекло проводят 5-6 раз через верхнюю, наиболее горячую, часть пламени спиртовки. Продолжительность контакта стекла с пламенем составляет 5-6 секунд.

Надежность фиксации мазка проверяют следующим способом: если прикосновение стекла к тыльной стороне ладони вызывает ощущение легкого жжения, то мазок зафиксирован надежно. При недостаточной фиксации мазок не будет закреплен на стекле, в то же время избыточная фиксация или фиксация влажного мазка приводит к денатурации белка, нарушению структуры и морфологии бактериальной клетки.

Простой способ окраски

Окрашивание простым методом осуществляется одним красителем (водным раствором фуксина Пфейффера или метиленовым голубым Лёффлера). На фиксированный мазок пипеткой наносят несколько ка-

пель красителя. Водным раствором фуксина Пфейффера окрашивают 1-2 мин, метиленовым голубым – 3-5 мин. Краситель смывают водой, затем мазок высушивают и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа.

Вопросы для самоподготовки

1. Из каких частей состоит оптический микроскоп?
2. Какие элементы входят в оптическую систему микроскопа?
3. Объектив. Какие увеличения имеют объективы микроскопа?
4. Что такое иммерсионная система микроскопа. Как распознать иммерсионный объектив?
5. Как определяется общее увеличение микроскопа?
6. Что такое разрешающая способность микроскопа. От каких частей микроскопа она зависит?
7. Конденсор, его назначение.

Лабораторная работа № 2. Морфология микроорганизмов-прокариот. Основные формы бактериальных клеток

Цель работы – изучить основные формы бактерий путем микроскопирования на примере отдельных представителей.

Оборудование и материалы: оптические микроскопы, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовки, красители, культуры микроорганизмов.

Ход работы

Задание 1. Приготовить фиксированный, окрашенный фуксином препарат микрококка *Micrococcus agilis* (*micro* – маленький, *coccus* – шарик, *agilis* – подвижный). Нанести каплю кедрового масла на препарат. Рассмотреть под микроскопом с иммерсионной системой. Найти одиночно лежащие округлые клетки, характерные для микрококка, зарисовать их.

Задание 2. Приготовить фиксированный, окрашенный фуксином, препарат диплококка *Azotobacter chroococcum*. Родовое название отражает его способность усваивать атмосферный азот, видовое – способность продуцировать коричневый пигмент (*chroo* – коричневый) и

шаровидную форму. На готовый препарат нанести каплю кедрового масла и рассмотреть его под микроскопом с иммерсией. Найти расположенные попарно клетки, зарисовать.

Задание 3. Приготовить фиксированный, окрашенный фуксином препарат сарцины *Sarcina flava* (*flava* – желтая). Под микроскопом с иммерсионной системой рассмотреть клетки сарцин, имеющие вид упорядоченных скоплений по 8 клеток, образующих правильные кубы (с каждой стороны сарцины видно по 4 клетки), зарисовать их.

Задание 4. Приготовить фиксированный и окрашенный фуксином препарат спорообразующей палочковидной бактерии *Bacillus tuscoïdes*. Обратить внимание на то, как прокрашены клетки. Клетки данной культуры под микроскопом выглядят неравномерно окрашенными. У них формируется спорогенная зона значительно более плотная, чем цитоплазма, и хуже воспринимающая краситель. При зарисовке следует также отобразить тот факт, что клетки образуют цепочки (стрептобациллы).

Задание 5. Приготовить препарат железобактерий *Leptothrix* (нитчатые формы бактерий) в раздавленной капле. На покровное стекло с препаратом железобактерий нанести кедровое масло. Просмотреть под микроскопом с иммерсионной системой. Препарат зарисовать.

Задание 6. Приготовить, используя навозную жижу (предварительно подготовленную), фиксированный препарат; окрасить фуксином. Под микроскопом с масляной иммерсией найти среди других спириллы (в виде завитка буквы С или двух завитков в виде латинской буквы S).

Задание 7. Приготовить препарат из зубного налета (фиксированный). Окрасить фуксином. Просмотреть с иммерсионной системой. Зубные спирохеты – тонкие, почти волосовидные, с большим числом крутых завитков. Зарисовать.

Вопросы для самоподготовки

1. Шаровидные формы бактерий. Как могут располагаться у них клетки?
2. Как располагаются клетки у микрококка, диплококка, стрептококка, тетракокка, сарцины.
3. Палочковидные формы бактерий. Как могут располагаться клетки у них?

4. Какую функцию выполняют споры у бактерий? Сколько спор находится в клетке бактерий?
5. Чем по внешнему виду отличаются вибрионы от спирилл, спириллы от спирохет?
6. Какие процессы в природе вызываются вибрионами, спириллами, спирохетами?
7. Относятся ли спирохеты к истинным бактериям?

Лабораторная работа №3. Морфология микроорганизмов-эукариот. Дрожжевые и плесневые грибы

Цель работы – изучить особенности строения микроскопических грибов.

Оборудование и материалы: оптические микроскопы, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовки, красители, культуры микроскопических грибов.

Ход работы

Задание 1. Приготовить препарат «раздавленная капля» из жидкой культуры пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisia*. Просмотреть его под микроскопом с иммерсионной системой. На препарате будут видны две расы дрожжей: одна раса представлена округло-эллипсоидными клетками, другая – удлинённо-цилиндрическими клетками, образующими при почковании ветвистые кустики. Препарат зарисовать.

Задание 2. Приготовить препарат *Mucor mucedo* в «раздавленной капле» следующим образом. Осторожно одной петлей взять небольшое количество мицелия и другой препаровальной иглой снять его в каплю воды на предметное стекло. Накрыть покровным стеклом. Просмотреть без иммерсии при увеличении объектива х8 и х40. На препарате следует найти гладкие «головки» мукора (споры у него эндогенные). Зарисовать препарат.

Задание 3. Препарат *Aspergillus niger* в «раздавленной капле» готовят из небольшого количества мицелия, взятого бактериологической петлей на границе между черным и коричнево-черным участками колоний. Другой бактериологической петлей снимают мицелий, накрывают покровным стеклом. Изучают препарат без иммерсии (объектив х8). Основное внимание уделяют краям исследуемого об-

разца мицелия. Когда найден подходящий участок мицелия, переводят объектив с увеличением х8 на х40. Освещенность препарата регулируют конденсором. Зарисовывают конидиеносец с цепочками конидий, располагающихся экзогенно.

Задание 4. Препарат *Penicillium expansion* в «раздавленной капле» готовится так же, как и препарат *Aspergillus niger*. Рассматривается под микроскопом, как в предыдущем случае. При просмотре следует обратить внимание на строение конидиеносцев. Грибы этого рода называются кистевиками. Каждый отдельный пучок конидиеносцев, выходящих как бы из одной точки, очень напоминает рисовальные кисти. Препарат зарисовать.

Вопросы для самоподготовки

1. Чем отличаются эукариоты от прокариот?
2. Формы, размеры и размножение дрожжевой клетки.
3. Функции дрожжей в природе и их роль в жизнедеятельности человека.
4. Можно ли различить микроструктуры в клетках дрожжей при просмотре препарата с иммерсионной системой микроскопа?
5. Вегетативное и половое размножение микроскопических грибов.
6. Какое происхождение споры у гриба муцора и какое – у грибов аспергилла и пеницилла (экзо- или эндоспоры)?

Лабораторная работа № 4. Сложные методы окраски. Строение микробной клетки. Запасные питательные вещества

Цель работы – познакомиться с основными сложными методами окраски микроорганизмов, изучить внутреннее строение микробной клетки.

Оборудование и материалы: оптические микроскопы, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовки, красители, культуры микроорганизмов.

Ход работы

Задание 1. На одном предварительно обезжиренном стекле приготовить порознь два фиксированных мазка микроорганизмов. В ка-

честве объектов взять грамположительные бактерии *Bacillus cereus* и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*. Чтобы препарат был хорошим, мазки должны быть едва заметны на стекле. Препарат окрасить по Граму, микроскопировать под масляной иммерсией. Найти на препарате клетки *Bacillus cereus* палочковидной формы сине-фиолетового цвета и мелкие палочки *E.coli*, окрасившиеся только фуксином в красный цвет. Зарисовать цветными карандашами клетки грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Окраска по Граму. На высушенный и зафиксированный препарат кладут полоску фильтровальной бумаги, на которую наносят несколько капель генцианфиолетового красителя на 2 мин. Краситель стряхивают и, не промывая водой, наносят на него раствор Люголя на 2 мин. Раствор Люголя сливают и, не промывая, обрабатывают 96%-м спиртом в течение 30 секунд.

Препарат промывают водой, окрашивают фуксином Пфейффера 2 мин, после чего фуксин сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под масляной иммерсией.

Задание 2. Для знакомства со спорами приготовить фиксированный препарат спорообразующего микроорганизма *Bacillus mesentericus*. Окрасить препарат методом Пешкова и микроскопировать под масляной иммерсией. На препарате найти палочковидные окрашенные в красный цвет клетки *Bacillus mesentericus* с голубыми спорами внутри. Препарат зарисовать цветными карандашами.

Окраска спор по Пешкову. На фиксированный препарат спорообразующих микроорганизмов наносят несколько капель метиленового синего Лёффлера и окрашивают над пламенем спиртовки в течение 15-20 с. Промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят 0,5% раствором нейтрального красного в течение 30 с. Затем промывают водой и высушивают.

Задание 3. Окраска капсул по методу Омелянского. Нанести каплю карболового фуксина и каплю воды на предметное стекло. Поместить в каплю красителя исследуемую культуру бактерий *Azotobacter chroococcum* и выдержать 2-3 мин. Добавить каплю жидкой черной туши и тщательно перемешать. Накрыть покровным стеклом и микроскопировать с объективом x40 и x100 с масляной иммерсией. На препарате на общем темном фоне найти бесцветные капсулы, окружающие окрашенные в красный цвет клетки бактерий. Зарисовать микроскопическую картину.

Задание 4. Окраска гликогена. На чистое предметное стекло нанести небольшую каплю жидкой культуры дрожжей пекарских (*Saccharomyces cerevisia*) и затем добавить к ней небольшую каплю раствора йода в йодиде калия (раствор Люголя).

Накрыть каплю покровным стеклом, избыток жидкости удалить фильтровальной бумагой. Препарат просмотреть под микроскопом с масляной иммерсией (кедровое масло наносят на покровное стекло).

Найти клетки, в которых содержится гликоген (он окрашивается в тона от желтого до желто-коричневого, коричнево-бурого цвета). Обратить внимание на почкующиеся клетки: материнская клетка более темно окрашивается (в ней больше гликогена – запасного питательного вещества), дочерняя окрашивается слабо, содержание гликогена в ней невелико. Зарисовать препарат цветными карандашами.

Задание 5. Окрашивание гранулёзы. Приготовить препарат «раздавленная капля», используя накопительную культуру маслянокислых бактерий рода *Clostridium*.

Пипеткой или бактериологической петлей из придонного слоя накопительной культуры взять суспензию клеток и небольшую каплю суспензии нанести на предметное стекло.

В указанную каплю добавить раствор йода в йодном калии (раствор Люголя), накрыть покровным стеклом, удалить избыток жидкости фильтровальной бумагой.

Препарат микроскопировать с масляной иммерсией. Найти мелкие, подвижные (они живые) палочковидные клетки. Чаще всего они имеют челночную форму вследствие образования споры в центре клетки, диаметр которой больше, чем поперечник.

Раствор Люголя окрашивает в сине-фиолетовый цвет гранулёзу. Гранулёза обычно локализуется ближе к концу клетки, в некоторых случаях она занимает большую ее часть. Зарисовать препарат.

Задание 6. Окрашивание жира. Для окрашивания жира используют старые культуры *Saccharomyces cerevisia*. На предметное стекло нанести небольшую каплю 40%-го формалина.

Петлей в нее добавить клетки указанной культуры. Формалин убивает клетку и разрыхляет ее оболочку.

Через 5 минут сюда же добавить небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин – каплю Судана III (растворимого в жире красителя – индикатора жироподобных веществ).

Образовавшуюся каплю накрыть покровным стеклом и удалить избыток жидкости фильтровальной бумагой. Препарат просмотреть под микроскопом с масляной иммерсией.

Отметить ярко-красные включения жира в сине-голубых клетках. Зарисовать микроскопическую картину.

Вопросы для самоподготовки

1. Какую роль выполняют включения гликогена в клетках бактерий и дрожжей?
2. Какую роль выполняют включения жира в клетках прокариот и эукариот?
3. Для каких бактерий характерно присутствие в клетках гранулезы?
4. В каких условиях накапливаются в клетках жир, гликоген и гранулеза?
5. Каков принцип окраски спор в клетках бактерий?
6. Какие микроорганизмы называются грамположительными и почему?
7. Чем отличаются грамотрицательные бактерии от грамположительных?
8. В чем суть окраски по Граму?

МОДУЛЬ 2 ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 5. Питательные среды. Методы стерилизации

Цель работы – познакомиться с техникой приготовления питательных сред, методами стерилизации сред, посуды и материалов.

Оборудование и материалы: готовая сухая питательная среда МПА, колбы, ватно-марлевые пробки, чашки Петри, пипетки, пробирки, физиологический раствор, шпатели Дригальского, тест-культуры микроорганизмов, паровой стерилизатор (автоклав), водяная баня.

Питательная среда является важнейшей составляющей любого микробиологического исследования. На ней осуществляется выделение чистых культур из сложных ассоциаций, в которых микроорганизмы обычно встречаются в природе, изучение морфологических, биохимических свойств или продуктов их жизнедеятельности.

Различные виды микроорганизмов характеризуются значительными различиями в обмене веществ, для выделения и культивирования используют разные питательные среды, при составлении которых особое значение имеет вопрос создания оптимальных условий для роста и размножения бактерий. Изготавливают среды с учетом ряда общих физико-химических принципов:

- питательные среды должны содержать определенные химические вещества, необходимые для роста и размножения бактерий: источники азота, углерода, кислорода, водорода, неорганические соли, факторы роста;
- быть достаточно влажными и изотоническими;
- обладать большой буферностью;
- иметь определенную активную реакцию (рН) и окислительно-восстановительный потенциал;
- обладать определенной вязкостью;
- быть стерильными.

Классификация питательных сред

1. *По консистенции* питательные среды разделяют на плотные (твердые), полужидкие и жидкие.

Плотные питательные среды получают путем прибавления к жидкому субстрату желатина или агар-агара. Желатин представляет собой кислый азотистый продукт, состоящий из белка и получаемый путем выварки хрящей и костей; к питательному субстрату желатин прибавляют обычно в количестве 10–12%.

Агар-агар – растительный коллоид, получаемый из морских водорослей. В его состав входят главным образом полисахариды с ничтожным количеством азотистых веществ. Агар способен образовывать в воде гель. Большинство микроорганизмов не расщепляют агар ввиду отсутствия у них фермента целлюлазы. Прибавляют агар-агар к питательному раствору в количестве 1,5–2%.

Температура плавления и застывания желатина – около 24°C. Температура плавления агар-агара – около 100°C, застывания – около 40°C.

Для получения полужидких питательных сред к жидкой основе добавляют 0,2–0,4% агар-агара.

2. **По составу** выделяют белковые, безбелковые и минеральные среды.

3. **По происхождению** среды разделяют на искусственные и естественные (природные):

а) искусственные среды:

- животные (МПА, МПБ, МПЖ);
- растительные (настои сена и соломы, отвары злаков, дрожжей или фруктов, пивное сусло и др.);

б) естественные среды:

- животные (кровь, сыворотка, желчь);
- растительные (кусочки овощей и фруктов).

4. **По назначению:**

а) среды консервирования (для первичного посева и транспортировки) предупреждают отмирание патогенных микроорганизмов и подавляют рост сапрофитов. Например: глицериновая смесь (среда Тига), гипертонический раствор, раствор цитрата натрия и др.;

б) среды обогащения для накопления определенной группы бактерий за счет создания условий, оптимальных для одних видов и неблагоприятных для других. Наиболее часто в качестве подобных агентов используют различные красители и химические вещества – соли желчных кислот, антибиотики, фуксин, генциановый фиолетовый, бриллиантовый зеленый и др. Например: среда Мюллера, Китта-Тароцци, селенитовый бульон, тиогликолевая среда;

в) среды для культивирования – универсальные простые и сложные среды. Например: МПА, МПБ, МПЖ и др.;

г) элективные и селективные среды применяют для первичного посева материала или для пересева с консервирующих сред или сред обогащения с целью дальнейшего получения чистой культуры. Среда готовят с учетом биохимических и энергетических потребностей микроорганизмов. Например: Эндо, Плоскирева, Мак Конки;

д) дифференциально-диагностические среды предназначены для изучения и индикации отдельных типов, видов и групп бактерий. В качестве основы применяют различные органические и неорганические соединения, гидролизаты казеина, пептонную воду, дополненные углеводами, спиртами, мочевиной и другими веществами; при их расщеплении происходит сдвиг рН в кислую (углеводы, спирты, липиды) или щелочную (белки) сторону. Соответственно выделяют среды с углеводами и спиртами, среды с мочевиной, среды для опре-

деления индолообразования, среды для определения протеолитической активности и т.д. В такие среды также часто вносят различные индикаторы (бромтимоловый синий, индикатор Андраде, крезоловый красный), помогающие визуально определить изменение pH, характерное для различных микроорганизмов.

Все дифференциально-диагностические среды разделяют на 4 основные группы:

- содержащие белки, дающие характерные изменения под действием бактериальных ферментов (кровь, желатин, молоко и др.); их применяют для определения гемолитических или протеолитических свойств. Наиболее часто распространенными средами являются МПЖ, свернувшаяся лошадиная сыворотка, молоко и кровяной агар;
- содержащие индикаторы, углеводы и многоатомные спирты; ферментативное расщепление приводит к сдвигу pH и изменению окраски среды. Например: пестрый или цветной ряд с различными моносахаридами, дисахаридами, полисахаридами и спиртами;
- среды для определения редуцирующей способности. В эту группу входят среды с красками, обесцвечивающимися при восстановлении, а также среды с нитратами для определения денитрифицирующей активности бактерий;
- среды, включающие вещества, ассимилируемые только определенной группой бактерий. Наиболее распространенными средами данной группы являются цитратный агар Симмонса и цитратная среда Козера.

Методы стерилизации

Стерилизацией, или обеспложиванием, называется полное уничтожение бактерий в какой-либо среде.

Физические методы

Термическая обработка. Термическая обработка применима лишь в отношении термоустойчивых материалов. Имеется множество вариантов термической обработки, но наиболее простые и доступные методы – прокаливание и кипячение.

Пастеризация – процесс **одноразового** нагревания чаще всего жидких продуктов или веществ до 60°C в течение 60 минут или при температуре 70-80 °C в течение 30 мин. Технология была открыта в середине XIX века французским микробиологом Луи Пастером.

При такой обработке в продукте **погибают только вегетативные клетки** микроорганизмов, а **споры остаются жизнеспособными** и при возникновении благоприятных условий из них начинают интенсивно развиваться вегетативные клетки. Поэтому пастеризованные продукты (молоко, пиво и др.) хранят при пониженных температурах в течение ограниченного периода времени. Считается, что пищевая ценность продуктов при пастеризации практически не изменяется, так как сохраняются вкусовые качества и ценные компоненты (витамины, ферменты).

В зависимости от вида и свойств пищевого сырья используют разные режимы пастеризации. Различают **длительную** (при температуре 63-65°C в течение 30-40 минут), **короткую** (при температуре 85-90°C в течение 0,5-1 минуты) и **мгновенную** пастеризацию (при температуре 98°C в течение нескольких секунд). Пастеризация **не может применяться** в консервировании продуктов, так как герметично закрытая тара является благоприятной средой для прорастания спор анаэробной микрофлоры. В целях долговременного консервирования продуктов (в особенности первоначально загрязненных почвой грибов или ягод), а также в медицинских и фармацевтических целях применяют дробную пастеризацию – тиндализацию.

Тиндализация – метод дробной стерилизации при низких температурах (предложил Тиндэлл) – включает ежедневное прогревание сред при 56-58°C в течение 5-6 суток. Он основан на поочередном уничтожении вегетативных клеток, проросших спор. Основной недостаток способа – невозможность полного уничтожения микроорганизмов (некоторые споры не успевают прорасти в указанных временных интервалах, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры). Метод также используют для стерилизации питательных сред, свойства которых изменяются под действием высокой температуры, например, жидкостей, содержащих в своем составе белок.

Стерилизация сухим жаром. Проводится в сухожаровых шкафах при 160°C в течение 2 часов; метод позволяет эффективно уничтожать не только вегетативные клетки (погибают в течение нескольких минут), но и споры микроорганизмов. Подобные воздействия разрушают структуру большинства органических соединений и ведут к значительному испарению жидкостей, поэтому метод используют для стерилизации лабораторной посуды и сухих материалов.

Стерилизация текучим паром производится нагреванием стерилизуемых предметов в кипятильнике Коха по 30 минут ежедневно в течение 3 дней подряд. В промежутках между стерилизациями материал выдерживают при комнатной температуре. Во время первого нагревания происходит гибель содержащихся в материале вегетативных форм бактерий, в то время как споры сохраняют жизнеспособность. В последующие сутки во время выдерживания стерилизуемого материала при комнатной температуре часть спор прорастает и превращается в вегетативные формы, погибающие при повторных прогреваниях. Такой метод получил название *дробной стерилизации*.

Кипятильник Коха представляет собой цилиндр, закрывающийся сверху коническим шлемом.

На дно кипятильника наливается вода, а над поверхностью воды устанавливается подставка с отверстиями для прохождения пара, на которой и помещают стерилизуемые предметы. Время стерилизации отсчитывается, начиная с момента энергичного выделения пара. Текучим паром стерилизуют главным образом питательные среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100°C.

Стерилизация паром под давлением (автоклавирование) включает обработку влажным паром (112-121°C) под давлением (0,5-1 атм.); наиболее эффективна для стерилизации термостабильных жидкостей. Термоустойчивые споры микроорганизмов в подобных условиях погибают за 15 минут. В бактериологических лабораториях для этих целей используют автоклавы.

Облучение электромагнитными волнами разной длины. Ультрафиолетовые (УФ) лучи (длина волны (γ) от 100 до 400 нм) воздействуют на нуклеиновые кислоты. Бактерицидное действие ультрафиолетовых лучей основано на разрыве водородных связей в молекуле ДНК, что приводит к появлению нежизнеспособных мутантов.

Применение УФО для стерилизации питательных сред и материалов ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглощательной активностью воды и стекла. Используется для стерилизации воздуха.

Рентгеновское и γ -излучение эффективно используется для стерилизации большинства материалов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. Облучение вызывает образование свободных радикалов, денатурирующих нуклеиновые кислоты и белки, что и приводит к гибели клетки.

Микроволновое излучение используют для быстрой повторной стерилизации длительно хранящихся сред. Стерилизующий эффект достигается за счет быстрого подъема температуры.

Ультразвук вызывает деполяризацию органоидов микробных клеток и денатурацию составляющих их молекул (в результате местного нагревания).

Стерилизация фильтрованием через различные природные (каолин, инфузорная земля) или искусственные материалы обеспечивает эффективную задержку на фильтрах бактерий и эукариотических микроорганизмов. Мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм эффективно задерживают бактерии, но не их споры и вирусы, таким образом, не обеспечивают полной стерилизации жидкостей и газов.

Химические методы

Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов включают:

– применение дезинфекантов и антисептиков, дающих неспецифический бактерицидный эффект. Применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов, обозначают термином *дезинфеканты*, а вещества, используемые для обработки живых тканей, – *антисептики*. Дезинфицирующие средства оказывают бактерицидное действие (хлорная известь, карболовая кислота, формальдегид и пр.), а антисептики (озон, спиртовой раствор (5%) йода, раствор перекиси водорода (3%), калия перманганат, 70% спирт и др.) в зависимости от концентрации – бактерицидное или бактериостатическое;

– использование антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов, проявляющих избирательное противомикробное действие. Природные антибиотики – фитонциды – продуцируют различные растения, их образование направлено на ингибирование жизнедеятельности или уничтожение других организмов. Примером синтетические химиотерапевтических средств являются сульфаниламидные препараты.

Ход работы

Задание. Подготовить посуду (пипетки, колбы с ватно-марлевыми пробками, чашки Петри, шпатели Дригальского и др.) для стерилизации (завернуть в бумагу).

Приготовить 250 мл универсальной питательной среды для культивирования микроорганизмов (МПА), используя сухую питательную среду промышленного производства.

Простерилизовать заранее приготовленный физиологический раствор, разлитый в 12 пробирок по 5 мл, питательные среды и посуду автоклавированием (режим стерилизации 1 атм., 20 минут). Стерильную питательную среду разлить в 12 стерильных чашек Петри.

Сделать смыв микроорганизмов (*p. Staphylococcus* – 18-часовая культура, *p. Bacillus* – 18-часовая и 6-суточная культуры) 5-ю мл стерильного физиологического раствора со скошенного МПА. Проверить их морфологическую форму. На фиксированном препарате, окрашенном простым способом, 18-часовые культуры микроорганизмов представлены вегетативными формами клетки, а 6-суточная культура *p. Bacillus* в виде спор.

Подвергнуть смывы микроорганизмов различным методам стерилизации: пастеризации (60°C в течение 30 минут), кипячению (100°C в течение 10 минут), автоклавированию (121°C в течение 15 минут). После стерилизации пробирки очень быстро охладить в холодной воде.

Для контроля качества стерилизации по 1 капле из каждой пробирки посеять поверхностным способом на застывшую питательную среду (МПА). Для контроля жизнеспособности микроорганизмов сделать посев на МПА из пробирок, не подверженных стерилизации. Посевы инкубировать при температуре 30°C не менее 72 часов.

Учет. Отсутствие роста на чашках Петри с МПА после термостатирования означает, что выбранные режимы стерилизации оказались достаточными для уничтожения микроорганизмов. Результаты занести в таблицу. Сделать вывод об устойчивости изученных форм микроорганизмов к воздействию температуры.

Культура микроорганизма	Наличие роста на МПА (+/-)			
	без стерилизации	пастеризация	кипячение	автоклавирование
<i>p. Staphylococcus</i> , 18-часовая культура (вегетативная форма)				
<i>p. Bacillus</i> , 18-часовая культура (вегетативная форма)				
<i>p. Bacillus</i> , 6-суточная культура (споры)				

Вопросы для самоподготовки

1. Назначение питательных сред.
2. Основные требования, предъявляемые к питательным средам.
3. Классификация питательных сред по консистенции, составу, происхождению, назначению.
4. Элективные питательные среды, их назначение.
5. Что такое стерилизация?
6. Физические методы стерилизации.
7. Химические методы стерилизации.
8. Какие методы используются для стерилизации посуды, инструментов?
9. Перечислить методы, используемые для стерилизации питательных сред.

Лабораторная работа № 6. Значение отдельных питательных элементов в жизнедеятельности микроорганизмов

Цель работы – выявить роль отдельных питательных элементов в развитии микроорганизмов.

Оборудование и материалы: 20%-й раствор сахарозы, 10%-е растворы солей, необходимые для приготовления питательных сред, споры плесневого гриба *Aspergillus niger*.

В состав микробной клетки входит целый ряд элементов, участвующих в строении многих составных частей протоплазмы. Среди этих элементов важными являются так называемые органогенные элементы: углерод, азот, кислород и водород, а также зольные элементы: сера, фосфор и другие.

Поскольку каждый из этих элементов является непременной составной частью микробной клетки, то вполне естественно, что развитие микроорганизмов требует обязательного их наличия в составе питательного субстрата.

Кроме указанных элементов для развития микроорганизмов необходимо наличие и микроэлементов: магния, кальция, железа, цинка и других.

Для того чтобы убедиться, что любой из указанных элементов имеет важное значение для развития микроорганизмов, нужно поста-

вить простой опыт с плесневым грибом *Aspergillus niger*, как на полной питательной среде, так и на среде с исключением того или иного элемента.

Рост гриба на разных средах покажет, как влияет на его развитие отсутствие того или иного элемента.

Ход работы

Опыт включает восемь вариантов, из которых один (контроль) содержит все необходимые для нормального развития *Aspergillus niger* элементы (полная питательная среда – контроль).

В каждой из остальных вариантов исключается тот или иной элемент.

Рост гриба в разных вариантах опыта показывает, как сказывается отсутствие того или иного элемента на его развитие.

Варианты опыта

1. ***Контроль*** – полная питательная среда (%).

Сахароза – 10,0;

NH_4NO_3 – 0,3;

KH_2PO_4 – 0,2;

MgSO_4 – 0,05;

FeSO_4 – 0,01.

2. ***Среда без углерода***. Из полной питательной среды исключается сахароза.

3. ***Среда без азота***. Из среды исключается NH_4NO_3 .

4. ***Среда без фосфора***. Из среды исключается KH_2PO_4 и заменяется другой солью, содержащей эквивалентное количество калия. Например, KCl .

5. ***Среда без калия***. Исключается KH_2PO_4 и заменяется эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

6. ***Среда без серы***. MgSO_4 и FeSO_4 заменяются эквивалентным количеством MgCl_2 и FeCl_3 .

7. ***Среда без магния***. MgSO_4 заменяется эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

8. ***Среда без железа***. FeSO_4 заменяется эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

Перед приготовлением питательной среды для соответствующего варианта необходимо рассчитать эквивалент солей, которые нужно внести вместо исключенных.

Атомная масса химических элементов

H – 1	Mg – 24	Cl – 35
O – 16	P – 31	K – 39
Na – 23	S – 32	Fe – 56

Пример расчета

Возьмем 4-й вариант, в котором из состава полной питательной среды исключен фосфор. Таким образом, KH_2PO_4 следует заменить на KCl. Рассуждаем следующим образом:

Молекулярная масса KH_2PO_4 – 136 (39 + 2 + 31 + 64),
а KCl – 74 (39 + 35).

По условиям опыта, KH_2PO_4 нужно было внести в количестве 0,2%. Прежде всего определяем количество заданного калия (X) в среде, для чего составляем пропорцию:

$$\frac{136 - 0,2\%}{39 - X} \quad X = \frac{39 \cdot 0,2}{136}$$

Затем вычисляем эквивалентное количество KCl (Y)

$$\frac{39 \cdot 0,2}{136} - 39 \quad Y = \frac{74 \cdot 39 \cdot 0,2}{136 \cdot 39} = 0,1$$

Следовательно, для определения эквивалентного процента заменяющей соли в вариантах нашего опыта нужно ее молекулярную массу умножить на процент заменяемой соли и разделить на молекулярную массу последней.

Методика постановки опыта

При приготовлении питательных сред для вариантов опыта используется 20%-й раствор сахарозы, 10%-е растворы солей.

Гриб *Aspergillus niger* – аэробный микроорганизм, поэтому при его культивировании слой среды должен быть тонким. В связи с этим в колбу Эрленмейера объемом 100 мл вносят по 30 мл питательной сре-

ды. Для каждого варианта рассчитывают количество веществ, которое необходимо внести в 30 мл питательной среды (в граммах, а затем в миллилитрах с точностью до второго знака).

Пример расчета

В среду нужно внести 10% сахарозы, но по методике опыта в колбах должно быть лишь 30 мл среды. Делаем соответствующий перерасчет количества сахарозы в граммах на 30 мл среды:

В 100 мл среды – сахарозы 10 г

В 30 мл среды – X г

$$X = \frac{30 \cdot 10}{100} = 3 \text{ г.}$$

Сахароза дана в виде 20% раствора. Надо определить, сколько миллилитров этого раствора содержат 3 г сахарозы:

В 100 мл 20%-го раствора – 20 г сахарозы

В Y мл 20%-го раствора – 3 г сахарозы

$$Y = \frac{100 \cdot 3}{20} = 15 \text{ мл.}$$

Подобным же образом рассчитывают все ингредиенты для каждого варианта. Опыт ставится нестерильно, поскольку элективные условия для роста гриба создаются с помощью высокой концентрации сахара и кислой реакции среды (за счет KH_2PO_4). В колбу со средой состава соответствующего варианта вносят споры гриба и закрывают ватной пробкой, прикрепляют этикетку с указанием варианта опыта и фамилии исполнителя, ставят в термостат и выдерживают при температуре 30°C в течение 5-7 суток.

Объем внесенных в колбу растворов суммируется, если он не достигает 30 мл, добавляют дистиллированную воду до целых миллилитров пипеткой.

Растворы сахарозы и солей набирают чистыми пипетками, которые тщательно моют водопроводной водой, а затем ополаскивают дистиллированной.

Учет результатов опыта. Визуально по внешнему виду пленок гриба, выросших в разных вариантах опыта, можно судить о значении каждого элемента для развития. За контроль принимают пленку, выросшую на полной питательной среде. Выводы для всех вариантов опыта заносят в тетрадь.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие элементы входят в состав клетки микроорганизмов?
2. Какую роль играет углерод в жизнедеятельности микробной клетки?

3. Роль азота в жизнедеятельности микробной клетки.
4. Сколько углерода входит в состав клеток микроорганизмов?
5. Какое соотношение углерода и азота в среде обитания необходимо клеткам микроорганизмов для жизнедеятельности?
6. Какова роль фосфора в жизнедеятельности микробной клетки?
7. Роль микроэлементов в жизнедеятельности микробной клетки.
8. Понятие об элективности среды. Почему гриб *Aspergillus niger* в нестерильных условиях на среде Буткевича будет развиваться без какой-либо конкуренции со стороны сопутствующей микрофлоры?
9. Чем определяются элективные условия при развитии гриба *Aspergillus niger* на среде Буткевича?

**Лабораторная работа № 7. Культивирование микроорганизмов.
Количественный и качественный учет микроорганизмов
в различных субстратах**

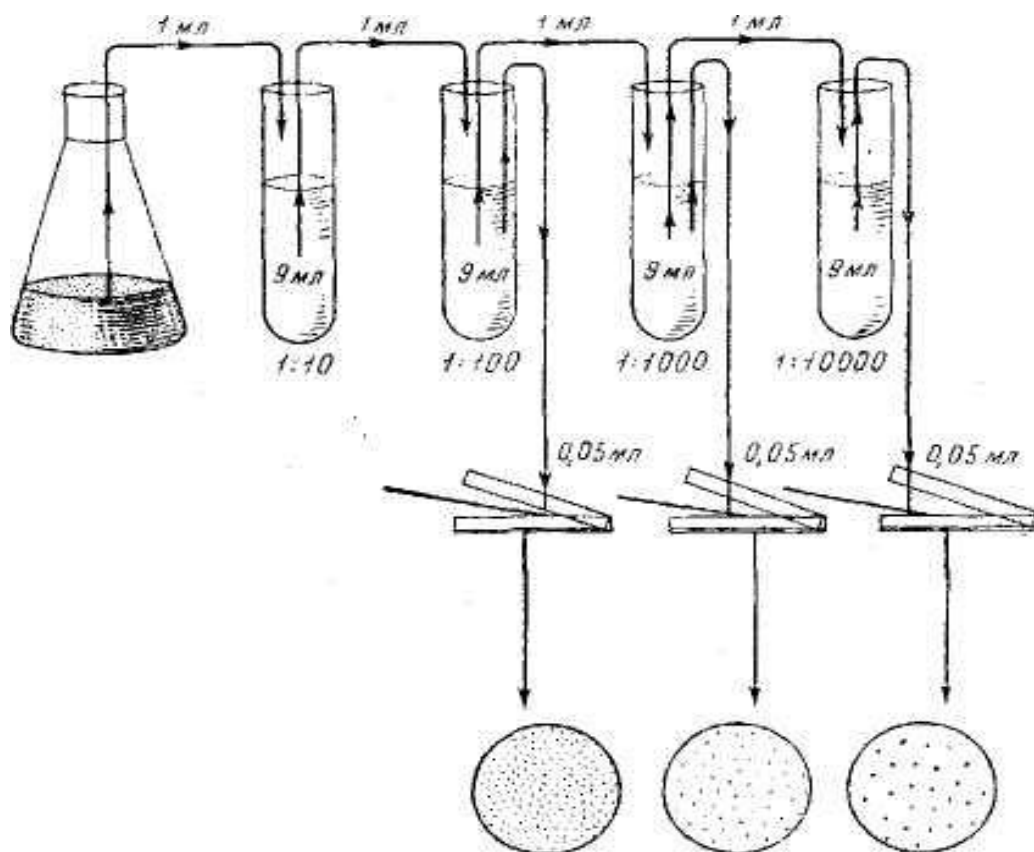
Цель работы – количественный и качественный учет микроорганизмов различных субстратов.

Оборудование и материалы: чашки Петри с МПА.

Ход работы

Метод питательных пластин используется для определения численности микроорганизмов в том или ином субстрате (косвенный метод учета микрофлоры); основан на возможности определять в чашках Петри с плотной питательной средой наличие живых клеток микроорганизмов. Каждая микробная клетка, попав на питательную среду, размножаясь и развиваясь, образует видимое невооруженным глазом скопление, именуемое колонией. Чтобы можно было подсчитать количество выросших на среде колоний, необходимо метод питательных пластин сочетать с методом предельных разведений.

Микробиологическому анализу обычно подвергают усредненный образец субстрата. В условиях асептики взвешивают 1 г анализируемого образца и стерильно переносят навеску в колбу с 99 мл стерильной воды, встряхивают в течение 5-10 мин, дают отстояться 1 мин. Это первое разведение 1:100. Из этого разведения стерильной пипеткой отбирают 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды, получают второе разведение 1:1000 и т.д. (см. рисунок).



Далее 1 мл суспензии (рабочего разведения) используют:

1) для посева на плотные агаризованные пластинки, которые заготовлены заранее следующим образом. Предварительно расплавленный и охлажденный до 40°C МПА вливают в стерильные чашки Петри и оставляют их до застывания. Каплю суспензии микроорганизмов из рабочего разведения растирают по поверхности питательной среды шпателем Дригальского (стерильным);

2) для посева глубинным способом – на дно стерильной чашки Петри выливают 1 мл суспензии, затем чашку заливают расплавленным МПА, равномерно распределяя его на поверхности дна чашки;

3) по окончании посева чашки помещают в термостат при температуре $28-30^{\circ}\text{C}$. Время инкубации 5-7 суток. В этот период клетки, попавшие на питательную среду, начинают активно размножаться и образуют колонии, которые в дальнейшем и учитывают.

Учет. Подсчитывают колонии, выросшие на чашках Петри. Крышку чашки Петри при этом не снимают, для удобства подсчитанную колонию отмечают точкой, пользуясь восковым карандашом.

При очень густом посеве (что возможно из-за отсутствия определенных навыков) подсчет делают следующим образом: дно чашки делят на равные секторы, подсчитывают количество колоний в несколь-

ких секторах, находят среднее арифметическое и умножают на количество секторов.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г навески определяют по следующей формуле:

$$A = \frac{б \cdot в \cdot г}{д},$$

где А – количество КОЕ в 1 г исследуемого образца;

б – количество колоний, выросших на чашке Петри;

в – количество капель в 1 мл (20);

г – разведение, из которого сделан посев;

д – навеска, г.

Например, среднее количество колоний в чашке Петри равно 45, рабочее разведение – 1:10000, тогда

$$A = \frac{45 \cdot 20 \cdot 10000}{1} = 9\,000\,000 \text{ КОЕ в 1 г субстрата.}$$

Метод Коха (метод «оседания») – используется для количественного учета микроорганизмов в воздухе. Он достаточно прост и точен.

Этим методом обнаруживают микроорганизмы, загрязняющие воздух различных помещений. В его основе – оседание микробных клеток с пылевыми частицами на поверхность стерильных агаровых пластин.

Чашку Петри с МПА (мясо-пептонным агаром) оставляют на 5 мин открытой (поверхностный посев) в обследуемом помещении. После окончания посева воздуха ее закрывают крышкой, на дне чашки восковым карандашом делают надпись о времени и месте посева. Чашку помещают в термостат при температуре 30°C для культивирования. Каждая микробная клетка, попавшая на среду, образует в результате размножения колонию. О степени загрязнения воздуха судят по численному содержанию микроорганизмов в 1 м³, наличию бактериальных и грибных.

Учет. Подсчитывают количество колоний, выросших на МПА, а затем, зная площадь дна чашки Петри, делают перерасчет на 1 м³ воздуха.

Считается, что на поверхность среды площадью 100 см² в течение 5 минут оседает такое количество микроорганизмов, которое содержится в 10 л воздуха (0,01 м³).

Пример расчета: в чашке Петри диаметром 10 см выросло 25 колоний. Площадь питательной среды в чашке Петри ($S = \pi R^2$) равна:
 $S = 3,14 \cdot 5^2 = 78,5 \text{ см}^2$.

Вычисляют количество колоний на площади, равной 1 дм² (100 см²):

$$\frac{25 \text{ колоний} - 78,5 \text{ см}^2}{X \text{ колоний} - 100 \text{ см}^2} = \frac{25 \cdot 100}{78,5} = 32 \text{ колонии}$$

Итак, на площади 1 дм² имеется 32 колонии. Пересчитывают количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 м³ воздуха:

$$\frac{32 \text{ колонии} - 10 \text{ л}}{X \text{ колоний} - 1000 \text{ л}} = \frac{32 \cdot 1000}{10} = 3200 \text{ КОЕ.}$$

Следовательно, в 1 м³ воздуха содержится 3200 КОЕ микроорганизмов.

Сведения, необходимые для характеристики степени загрязнения воздуха (количество выросших колоний, наличие среди них бактериальных и грибных), заносят в таблицу.

Пример

Помещение, воздух которого анализировали	Время отбора пробы	Количество колоний в чашке	Из них		Количество микроорганизмов в 1 м ³ воздуха (КОЕ)
			бактерии	грибы	
П-8	10 ⁰⁰	25	20	5	$3,2 \cdot 10^3$

Для качественной характеристики микроорганизмов, выделенных из воздуха, описывают культуральные признаки колоний.

Для изучения под микроскопом морфологических признаков микроорганизмов готовят фиксированный препарат, окрашивают по Граму.

Для выявления подвижности микроорганизмов готовят препарат «раздавленная капля». Все сведения заносят в таблицу.

Номер штамма	Культуральные признаки	Морфологические признаки	Окраска по Граму
1			
2			

Культуральные признаки

1. Форма колоний – круглая, круглая с валиком по краям, ризоидная, амёбовидная, нитевидная складчатая, неправильная, концентрическая, сложная.

2. Профиль колонии – *изогнутый, кратеровидный, бугристый, врастающий в агар-агар, плоский, выпуклый, каплевидный, конусовидный.*

3. Край колоний – *гладкий, волнистый, зубчатый, лопастный, реснитчатый, ворсистый, ветвистый.*

4. Поверхность – *гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая.*

5. Размеры колонии – *крупная (диаметр 10 мм и более), средняя (от 1 до 10 мм), точечная (не превышает 1 мм).*

6. Оптические свойства – *прозрачная, просвечивающаяся, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая.*

7. Цвет – *грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный.*

8. Структура колонии – *однородная, мелко- или крупнозернистая, пленчатая.*

9. Консистенция – *маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, врастающая в агар (определяется при приготовлении фиксированного препарата).*

Морфологические признаки *(изучаются с помощью микроскопа)*

1. Форма микробной клетки – *палочковидная, кокковидная, извитая.*

2. Способность к спорообразованию, *характер расположения спор, их размеры.*

3. Подвижность (наличие жгутиков) – *монотрихи, лофотрихи, перитрихи (определяется косвенно, по характеру передвижения в раздавленной капле или с помощью электронного микроскопа).*

4. Окраска по Граму – *грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.*

Метод «отпечатков»

Иногда в исследовательской практике для качественной характеристики микроорганизмов того или иного объекта используют метод, заключающийся в отпечатывании поверхности исследуемого образца на агаризованной элективной питательной среде. Наиболее часто данный метод используется в фитопатологических исследованиях.

В чашку Петри со стерильной питательной средой помещают объект и осторожно, не разрушая питательной среды, отпечатывают его (например, листовое образование растений с некрозом, сеянцы растений с признаками заболевания, можно исследовать микрофлору поверхности пальцев рук и т.п.).

После посева чашки Петри культивируют в термостате и через 4-7 дней производят учеты по ранее предложенной схеме: описывают колонии, готовят фиксированный препарат микробных клеток данной колонии, окрашивают по Граму, микроскопируют, заполняют таблицу.

Результаты изучения культуральных и морфологических признаков микроорганизмов, выделенных из разных сред обитания (почва, воздух, поверхность предмета), оформляют в виде выводов по каждому использованному методу отдельно.

Вопросы для самоподготовки

1. В чем заключается метод питательных пластин и для изучения каких объектов он предназначен?
2. Какие питательные среды используют для количественного учета микроорганизмов и почему их используют несколько?
3. Что представляет собой отдельная, выросшая колония? Откуда она взялась?
4. Как определить количество микроорганизмов в 1 г или 1 мл субстрата?
5. Что такое морфологические признаки бактерий?
6. Культуральные признаки бактерий и других микроорганизмов. Перечислить.
7. В чем сущность метода «оседания» Коха? Для чего он используется?

Лабораторная работа №8. Превращение микроорганизмами безазотистых органических веществ. Изучение биотехнологии процессов брожения и неполного окисления

Цель работы – изучить возбудителей и определить интенсивность процессов брожения и неполного окисления.

Оборудование и материалы: готовые питательные среды для постановки процессов брожения и неполного окисления, почва, дрожжи, бюретка с 0,1 н КОН, колбы, термостат.

При изучении различных процессов, вызываемых микроорганизмами, удобно пользоваться методом элективных культур. Сущность этого метода сводится к тому, что в среде создаются условия, при которых наиболее интенсивно может развиваться только один какой-нибудь вид или одна группа микроорганизмов.

Такие условия создаются за счет состава питательной среды, благоприятной только для развития искомого микроорганизма.

Создание благоприятных условий для развития определенной группы микроорганизмов не ограничивается только набором химических соединений питательной среды.

Большое значение имеют температура, присутствие или отсутствие кислорода, свет и целый ряд других внешних факторов. Зная физиологические особенности соответствующей группы микроорганизмов, подбирают такие условия их культивирования, при которых они лучше всего развиваются.

Ход работы

Спиртовое брожение представляет собой анаэробный процесс разложения углеводов с образованием спирта и углекислого газа. Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи *Saccharomyces cerevisia*. Для изучения спиртового брожения используют элективную синтетическую среду, %:

сахароза – 15,0;

пептон – 0,5;

KH_2PO_4 – 0,3;

MgSO_4 – 0,1.

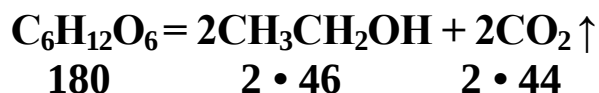
Элективной для дрожжей среду делает высокая концентрация сахара, слегка кислая среда за счет KH_2PO_4 , анаэробные условия, накопление в процессе опыта значительного количества спирта.

Задание 1. Указанную среду налить в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл высоким слоем, заразить культурой дрожжей, закрыть пробкой. Взвесить на технических весах с точностью до 0,01 г, прикрепить этикетку, на которой указать массу колбы в момент постановки опыта, номер группы, фамилию студента. Колбу оставить в термостате при 25°C.

Учет. Определение CO_2 . Углекислый газ, образующийся при брожении, определяют по разности веса колбы при постановке опыта и его окончании. Учет углекислого газа получается точный, так как в процессе брожения выделяется много CO_2 .

Расчет количества образовавшегося спирта и сброженного сахара

По массе выделившегося углекислого газа легко рассчитать количество образовавшегося спирта и сброженного сахара, воспользовавшись суммарным уравнением брожения и рассчитав молекулярную массу веществ:



Пример расчета: если в опыте образовалось 6 г CO₂, то:

$$\begin{array}{l} 88 - 92 \\ 6 \text{ г} - X \end{array} \quad X = \frac{6 \cdot 92}{88} = 6,3 \text{ г спирта}$$

$$\begin{array}{l} 180 - 88 \\ Y - 6 \text{ г} \end{array} \quad Y = \frac{6 \cdot 180}{88} = 12,3 \text{ г сброженного сахара}$$

Определение интенсивности брожения

Под интенсивностью брожения понимают количество сброженного сахара в процентах от исходного за известный промежуток времени.

Если 100 мл среды содержит 15 г сахара, то при сбраживании 12,3 г сахара интенсивность брожения составит:

$$\begin{array}{l} 15 \text{ г} - 100\% \\ 12,3 \text{ г} - X \end{array} \quad X = \frac{12,3 \cdot 100}{15} = 82\%$$

Микроскопическое исследование дрожжей

Из накопительной культуры готовят фиксированный препарат, окрашивают метиленовым синим. Изучают под микроскопом с масляной иммерсией. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя брожения – *Saccharomyces cerevisia* (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Молочнокислое брожение представляет собой анаэробное разложение углеводов молочнокислыми бактериями с образованием молочной кислоты и может быть выражено следующим суммарным уравнением:



Для изучения молочнокислого брожения лучше всего в качестве питательной среды использовать молоко, содержащее лактозу и другие необходимые питательные вещества. Молочнокислые бактерии попадают в молоко с оборудования, поверхности растений, поэтому оно не требует специального заражения культурой.

Задание 2. Свежее молоко разлить по 30-40 мл в колбы объемом 100 мл, закрыть их ватно-марлевыми пробками, подписать и поставить в термостат с температурой 30-35°C.

Определение начальной кислотности молока титрованием. В колбу пипеткой поместить 10 мл молока, прибавить 20 мл дистиллированной воды, 1-2 капли фенолфталеина и титровать 0,1н раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Количество 0,1н NaOH, пошедшей на титрование, записать в тетрадь, оно потребуется для определения начальной кислотности молока.

Учет. В колбе со скисшим молоком образуется ровный плотный сгусток без следов газа (если в опыте использовали свежее молоко). Сгусток получается вследствие того, что молочная кислота образует с казеинатом кальция казеин, который выпадает в осадок.

Определение накопившейся молочной кислоты. Количество образовавшейся молочной кислоты устанавливают по разности объемов 0,1н NaOH, пошедшей на титрование молока в конце опыта и при его постановке.

Для титрования взять 10 мл скисшего молока, поместить в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл, добавить 20 мл дистиллированной воды, 1-2 капли фенолфталеина и титровать 0,1н раствором NaOH до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

Кислотность молока выражается или в процентах молочной кислоты, или в градусах Тернера (1°Т – это 1 мл 0,1 н NaOH, пошедшей на титрование 100 мл).

Пример расчета. Если на титрование 10 мл молока пошло 23 мл щелочи, то для выражения **кислотности молока в градусах Тернера (Т°)** нужно это количество (23 мл) умножить на 10.

$$23 \cdot 10 = 230^\circ\text{T}.$$

Молекулярная масса молочной кислоты равна 90. Для приготовления 1 л 1н раствора этой кислоты требуется 90 г. В 1 л 0,1н раствора содержится 9 г, а в 1 мл – 0,009 г молочной кислоты.

Чтобы выразить **кислотность молока в процентах молочной кислоты**, следует количество мл 0,1н NaOH, потраченной на титрование 100 мл молока, умножить на 0,009, поскольку 1 мл 0,1 NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты

$$230 \cdot 0,009 = 2,07\%.$$

Микроскопическое исследование молочнокислых бактерий. Приготовить фиксированный, окрашенный метиленовым синим препарат из прокисшего молока. На препарате найти мелкие округлые клетки *Streptococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки и тонкие палочки *Lactobacterium* неодинакового размера.

Если на поверхности прокисшего молока образовалась пленка, то в мазке обнаруживается молочная плесень *Oidium lactis*, четырехугольные или овальные клетки которой легко отличить от молочнокислых бактерий по размеру. Эта молочная плесень окисляет молочную кислоту, снижая кислотность молока, что способствует дальнейшему развитию гнилостных бактерий.

Дают характеристику возбудителей брожения – *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium* (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки). Зарисовывают микроскопическую картину в тетрадь.

Брожение клетчатки имеет большое значение для круговорота углерода в природе, так как клетчатка попадает в почву и водоемы в огромных количествах.

По химическому составу клетчатка представляет собой полисахарид состава $(C_6H_{10}O_5)_n$. При воздействии фермента *целлюлазы*, выделяемого в среду целлюлозоразлагающими бактериями, она гидролизуется с образованием глюкозы по следующему уравнению:



Дальнейшее сбраживание продуктов гидролиза клетчатки сопровождается образованием масляной и уксусной кислот, а также водорода, метана и углекислоты.

Задание 3. Для знакомства с этим процессом в круглую плоскодонную колбу внести 1-2 г фильтровальной бумаги, нарезанной мелкими полосками, залить до верха средой следующего состава, %:

KNH_4HPO_4 – 0,2;

пептон – 0,1;

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1;$
 $\text{MgSO}_4 - 0,05;$
 $\text{CaCl}_2 - 0,03;$
 $\text{CaCO}_3 - 0,5.$

Среду заразить небольшим количеством почвы, закрыть колбу и поместить в термостат.

Элективные условия определяются наличием в качестве источника углерода и энергии клетчатки, которая разрушается только бактериями, продуцирующими фермент целлюлазу (целлюлозоразрушающими микроорганизмами), анаэробными условиями.

Через несколько дней при температуре 30-35°C в колбе начинается брожение клетчатки, которое длится 2-3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания ослизняется, желтеет и постепенно разрушается бактериями.

Учет. Микроскопия анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий: извлекают с помощью пинцета со дна колбы кусочки разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле. Мазок высушивают, фиксируют, окрашивают фуксином. На препарате находят длинные тонкие палочки с округлой спорой на конце – *Clostridium omelianskii*. Препарат зарисовывают. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя брожения (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Качественная реакция на масляную кислоту. В пробирку отбирают 5 мл накопительной культуры и прибавляют 1 мл раствора FeCl_3 , подогревают в пламени спиртовки. Образующееся маслянокислое железо изменяет окраску раствора с соломенно-желтого на темно-бурый (чайный) цвет, а в проходящем свете раствор кроваво-красный.

Маслянокислое брожение крахмала представляет собой процесс анаэробного разложения углеводов, при котором образуется значительное количество масляной кислоты, а также ряд других продуктов и газы – CO_2 и H_2 . Суммарное уравнение маслянокислого брожения:



Возбудители этого процесса широко распространены в природе. Это микроорганизмы р. *Clostridium*, характеризующиеся следующими свойствами: спорообразующие подвижные палочки, накапливающие в протоплазме гранулёзу, строгие анаэробы с оптимальной температурой развития 35-40°C, выдерживающие повышение температуры до 110-115°C в течение 5-10 мин.

Для накопительной культуры маслянокислых бактерий необходимо создать строго анаэробные условия, кроме того, после заражения ее почвой следует нагреть среду до 80°C для того, чтобы бесспорные микроорганизмы погибли, а спорообразующие маслянокислые бактерии остались жизнеспособными.

Задание 4. Неочищенный сырой картофель нарезают мелкими кусочками, заполняют им 1/4 или 1/3 объема высокой пробирки, заливают водой на 2/3 объема для создания анаэробных условий, добавляют мел для нейтрализации образующейся масляной кислоты и ставят в водяную баню с температурой 80°C на 10-15 мин (пастеризация). Затем термостатируют при температуре 35°C в течение 2-3 дней. При развитии маслянокислого брожения картофель всплывет на поверхность вследствие сильного газообразования.

Учет. Микроскопическое исследование. Готовят препарат «раздавленная капля», отобрав пипеткой каплю культуральной жидкости со дна пробирки. В препарат добавляют каплю раствора йода в йодиде калия (раствор Люголя). При микроскопировании с масляной иммерсией находят подвижные спорообразующие палочки *p. Clostridium*, окрашенные йодом в синий цвет (гранулёза). Препарат зарисовывают. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя брожения (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Качественная реакция на масляную кислоту. В пробирку отбирают 5 мл накопительной культуры и прибавляют 1 мл раствора FeCl₃, подогревают в пламени спиртовки. Образующееся маслянокислое железо изменяет окраску раствора с соломенно-желтого на темно-бурый (чайный) цвет, а в проходящем свете раствор кроваво-красный.

Неполное окисление органических веществ является аэробным окислительно-восстановительным процессом, в результате которого раствор этилового спирта окисляется до уксусной кислоты.

Возбудителями этого процесса являются уксуснокислые бактерии родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*. В природе уксуснокислые бактерии обитают на листьях, цветах и плодах многих растений. Их можно обнаружить в почве, виноградном соке, пиве, вине, молоке и кисломолочных продуктах.

Клетки уксуснокислых бактерий – граммотрицательные подвижные прямые или слегка изогнутые палочки, облигатные аэробы, мезофилы (оптимальная температура их роста – 25-30°C), ацидофилы (оптимальная pH 5,4 – 5,8, но могут развиваться и при pH 2,5).

Окисление спирта выражается следующим уравнением:



Неполное окисление углеводов лежит в основе получения пищевого уксуса. В бродильной промышленности при производстве пива или вина этот процесс является нежелательным, так как он приводит к закисанию этих продуктов.

Задание 5. В 2 колбы Эрленмейера емкостью 100 мл наливают по 50 мл непастеризованного пива, добавляют 5 мл 6% уксусной кислоты для подкисления среды и термостатируют при разной температуре. Одну колбу при температуре 20-22°C, другую при 25-35°C.

Через несколько дней на поверхности пива появляется серовато-белая пленка уксуснокислых бактерий. При температуре 20-22°C развивается *Acetobacter aceti*, а при температуре 25-35°C *Acetobacter pasteurianum*.

Для различия отдельных видов уксуснокислых бактерий пользуются внешним видом их пленок и их отношением к окраске йодом (раствором Люголя). Если на поверхности жидкости образовалась сухая и морщинистая пленка, то это *Acetobacter pasteurianum*, а если пленка гладкая, слизистая и не поднимается по стенкам – *Acetobacter aceti*, и, наконец, если она слизистая, гладкая и поднимается по стенкам колбы вверх – *Acetobacter kuttingianum*.

Пленчатые дрожжи образуют грубую и морщинистую пленку.

Микроскопическое исследование. Готовят из пленок препараты «раздавленная капля» с добавлением раствора Люголя. Находят палочковидные клетки с оболочкой, окрашенной в синий цвет – *Acetobacter pasteurianum*, в желтый цвет – *Acetobacter aceti*. Препарат зарисовывают. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя брожения (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое катаболизм и анаболизм?
2. При каком процессе (катаболизме или анаболизме) выделяется энергия?
3. В чем сходство между дыханием и брожением?
4. Сколько энергии выделяется в процессах аэробного дыхания, нитратного дыхания, брожения?
5. Какой катаболический процесс наиболее энергетически выгоден?

6. Сколько молекул АТФ образуется в схеме Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и каков энергетический выигрыш процесса брожения?

7. Назвать возбудителей спиртового брожения и дать им характеристику.

8. Как создать элективные условия для спиртового брожения? Какие конечные продукты образуются при спиртовом брожении, какие образуют дрожжи в аэробных условиях?

9. Дать физиологическую характеристику возбудителям спиртового брожения – дрожжам рода *Saccharomyces*.

10. Назвать возбудителей гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения.

11. Как относятся к кислороду молочнокислые бактерии?

12. Какие конечные продукты образуются при гетероферментативном молочнокислом брожении?

13. Где в природе распространены молочнокислые бактерии? Какие молочнокислые бактерии обитают в кишечнике человека, животных?

14. Назвать возбудителей маслянокислого брожения.

15. Как относятся маслянокислые бактерии к кислороду? Какие источники углерода и азота используют эти микроорганизмы?

16. Почему маслянокислые бактерии устойчивы к высоким температурам и другим факторам внешней среды?

17. Какие конечные продукты образуются при маслянокислом брожении?

18. Какую роль играют маслянокислые бактерии в почвах.

МОДУЛЬ 3 РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Лабораторная работа №9. Круговорот азота и роль микроорганизмов в нем. Превращение микроорганизмами органических и минеральных соединений азота

Цель работы – изучить возбудителей этапов круговорота азота и продукты их жизнедеятельности.

Оборудование и материалы: готовые питательные среды для воспроизведения процессов круговорота азота, почва, колбы Эрленмейера, мел, лакмусовая бумага, фильтровальная бумага, смоченная уксуснокислым свинцом, микроскопы, предметные и покровные стекла.

Азотфиксация свободноживущими микроорганизмами. Биологическая фиксация азота атмосферы имеет огромное значение для практики сельского хозяйства.

Свободноживущие почвенные бактерии *Azotobacter* и *Clostridium* обладают способностью присоединять молекулярный азот к плазме своего тела, увеличивая количество органического азота в природе. После их гибели почвенные горизонты обогащаются минеральными формами азота.

Накопительная культура свободноживущих азотфиксаторов ставится с использованием жидкой питательной среды, не содержащей солей азота (среда Эшби), следующего состава, %:

глюкоза – 2,0;

KH_2PO_4 – 0,2,

MgSO_4 – 0,2;

NaCl – 0,2;

K_2SO_4 – 0,1;

FeSO_4 – 2 капли 1% раствора

Задание 1. В колбу Эрленмейера емкостью 100 мл налить питательную среду Эшби на 2/3 объема. Добавить ложку мела (для нейтрализации образующейся при брожении масляной кислоты). Среду заразить почвой. Инкубировать посев при температуре 28°C.

Учет. Через несколько дней поверхность жидкости покрывается быстро бурящей пленкой аэробных бактерий *Azotobacter chroococcum*, а на дне колбы начинается маслянокислое брожение, вызываемое *Clostridium pasteurianum*, сопровождающееся выделением газов и масляной кислоты.

Для микроскопического исследования готовят 2 препарата «раздавленная капля». В первом препарате, приготовленном из побуревшей пленки, находят крупные круглые клетки *Azotobacter chroococcum*, покрытые слизистой капсулой, и часто объединенные по две. Для того чтобы увидеть капсулу, к капле жидкой культуры добавить каплю разведенной туши (см. лабораторную работу № 4).

Во втором препарате, приготовленном из капли жидкости, взятой ближе ко дну колбы, с добавлением капли йода в йодистом калии (раствор Люголя), находят характерные веретенообразные клетки *Clostridium pasteurianum*, с продолговатой спорой внутри.

Микроскопическую картину зарисовывают в тетрадь. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя процесса (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Проводят качественную реакцию на масляную кислоту с FeCl_3 (см. лабораторную работу № 8).

Аммонификация белков. Одним из наиболее распространенных почвенных микробиологических процессов является разложение растительных и животных остатков, содержащих органические азотистые вещества. Этот процесс минерализации органического азота, всегда сопровождающийся выделением аммиака, называется аммонификацией. Возбудителями процесса являются различные микроорганизмы (бактерии, актиномицеты и плесневые грибы). Процесс происходит как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

В качестве питательной среды для накопительной культуры аммонифицирующих микроорганизмов используют мясной бульон (МБ) с добавлением 3% пептона, который содержит азот только в органической форме.

Задание 2. В колбу Эрленмейера емкостью 100 мл наливают 30 мл среды и добавляют почву. Между пробкой и стенками горлового отверстия под пробку подвешивают две бумажки - красную лакмусовую (для обнаружения выделяющегося аммиака) и фильтровальную, предварительно обработанную уксуснокислым свинцом (для обнаружения сероводорода H_2S и метилмеркаптана). Бумажки не должны касаться среды. Опытные колбы помещают в термостат при температуре 28-30°C для культивирования.

Учет. Через 5-7 суток инкубации определяют продукты разложения белков и возбудителей процесса.

Определение продуктов гнилостного распада белковых веществ:

а) проба на аммиак – выделившийся в атмосферу аммиак улавливается подвешенной красной лакмусовой бумажкой, которая при этом синее;

б) проба на сероводород – сероводород обнаруживается с помощью подвешенной фильтровальной бумажки, смоченной уксуснокислым свинцом ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), которая чернеет. Если почерневшая бумажка покрывается серебристым налетом – это свидетельствует о том, что наряду с сероводородом образуется метилмеркаптан (CH_3SH).

Микроскопическое исследование. Готовят два препарата: препарат живых бактерий «раздавленная капля» и фиксированный, окрашенный фуксином. Чаще других в препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris* – неспорообразующей палочки. На препарате много

спорообразующих стрептобацилл *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Clostridium putrificus*. У последних диаметр спор крупнее и они расположены терминально. Из неспорообразующих преобладают палочки *p.Pseudomonas*.

Микроскопическую картину зарисовывают в тетрадь. Дают морфологическую и физиологическую характеристику возбудителя процесса (тип питания, способ получения энергии, отношение к кислороду, морфологические признаки).

Денитрификацией называется процесс восстановления солей азотной и азотистой кислот до свободного молекулярного азота. Денитрификацию различают прямую и косвенную. При прямой денитрификации восстановление нитратов осуществляется в результате жизнедеятельности особой группы бактерий, называемых денитрифицирующими.

Бактерии, вызывающие процесс денитрификации, являются факультативно-анаэробными микроорганизмами палочковидной формы, мелких размеров, спор не образуют. Энергию для своей жизнедеятельности они получают путем окисления углеводов в анаэробных условиях, используя кислород нитратов.

Представителями денитрифицирующих бактерий являются *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas denitrificans*.

Для изучения процесса денитрификации используется элективная питательная среда, обильно снабженная углеводами и содержащая азот в форме нитратов:

К-Na-виннокислый (сегнетова соль) – 20,0;

KNO₃ – 2,0;

KHPO₄ – 0,5;

MgSO₄ – следы;

вода дистиллированная – 1000 мл.

Задание 3. В колбу Эрленмейера емкостью 100 мл наливают среду высоким слоем (под горлышко) для создания анаэробных условий и добавляют почву. Колбу закрывают пробкой и помещают в термостат с температурой 28°C.

Учет. После 5-6 дней инкубации накопительную культуру подвергают анализу. Отмечают появление пузырьков (CO₂ и N₂) и позеленение среды, что указывает на развитие в среде *Pseudomonas fluorescens* или *Pseudomonas denitrificans*.

Микроскопическое исследование. Для обнаружения возбудителей денитрификации из срединного слоя культуральной жидкости бе-

рут каплю, готовят фиксированный препарат, окрашивают фуксином и изучают под микроскопом с иммерсионной системой. На препарате находят мелкие неспорообразующие палочки *Pseudomonas fluorescens* или *Pseudomonas denitrificans*. Результаты наблюдений зарисовывают в тетрадь. Дают характеристику морфологических и физиолого-биохимических признаков возбудителей процесса денитрификации.

Вопросы для самоподготовки

1. Какой процесс называют аммонификацией?
2. Назовите возбудителей процесса аммонификации в аэробных и анаэробных условиях.
3. Какие конечные продукты накапливаются в аэробных условиях? Какие в анаэробных?
4. Почему процесс аммонификации имеет большое значение для сельского хозяйства, хранения и переработки продуктов животноводства?
5. Какое соотношение углерода к азоту должно быть, чтобы в почве накапливался аммиак и почему?
6. Как свести к минимуму потери азота в виде аммиака при хранении навоза?
7. Назовите возбудителей первой и второй фазы нитрификации.
8. К какому типу питания по отношению к углероду относят нитрификаторов?
9. Что такое гетеротрофная нитрификация?
10. Назовите денитрифицирующие бактерии.
11. Почему процесс денитрификации имеет отрицательное агрономическое значение?
12. В каких условиях по отношению к кислороду идет процесс денитрификации?
13. Назовите свободноживущих азотфиксирующих аэробных и анаэробных бактерий.
14. Назовите симбиотических азотфиксирующих бактерий.
15. За счет энергии какого процесса фиксирует азот атмосферы азотобактер?
16. За счет энергии какого процесса фиксирует молекулярный азот *Clostridium*?
17. На чем основаны симбиотические отношения бобовых растений и клубеньковых бактерий? Что поставляют ризобии растению и что дают растения ризобиям?

18. Что является действующим началом азотобактерина?
19. Что является действующим началом нитрагина?
20. Что такое специфичность, вирулентность, активность клубеньковых бактерий?
21. Почему считается биологический азот энергетически выгодным и экологически чистым?
22. Как создать элективные условия для азотобактера?
23. Как создать элективные условия для клостридиума, чтобы он осуществлял процесс азотфиксации?

Лабораторная работа №10. Участие микроорганизмов в процессах трансформации фосфора

Цель работы – определить наличие в почве микроорганизмов, способных обеспечить растения фосфором из имеющихся запасов этого элемента.

Оборудование и материалы: среда Пиковской, среда Менкиной, чистая культура *Bac. megaterium var. Phosphaticum*, образцы почв.

Для наблюдения ***процесса мобилизации фосфора из органических соединений*** используют среду Менкиной, предварительно разлитую в чашки Петри, следующего состава, г/л:

нуклеиновая кислота (или лецитин) – 5,0;
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5;
NaCl – 0,3;
KCl – 0,3;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3;
 CaCO_3 – 5,0;
глюкоза – 10,0;
 FeSO_4 – следы;
агар-агар – 30,0.

Микроорганизмы, выделяющие фермент нуклеазу, отщепляют фосфорную кислоту, входящую в состав нуклеиновой кислоты (лецитина) питательной среды. Отщепленная фосфорная кислота образует зону растворения мела вокруг колоний этих микроорганизмов на чашках Петри. Контролем служат суспензии чистой культуры *Bac. megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-512.

Для наблюдения *процесса мобилизации фосфора из трудно-доступных соединений* используют среду Пиковской, предварительно разлитую в чашки Петри, следующего состава, г/л:

глюкоза – 20,0;
NaCl – 0,2;
Ca₃(PO₄)₂ – 5,0;
MgSO₄ – 0,1;
MgSO₄ – следы;
FeSO₄ – следы;
агар-агар – 20,0.

Микроорганизмы, разлагающие трехкальцевый фосфат, распознают по зонам растворения этого соединения вокруг колоний.

Задание 1. Каплю приготовленной суспензии почвы в разведении 1:100 засевают на поверхность вышеуказанных 2-х питательных сред. Посевы инкубируют при температуре 28-30°C в течение 6-7 дней.

Учет. По истечении срока на каждой среде отмечают колонии с зонами растворения и пересчитывают количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов, мобилизующих вторичные фосфаты на 1 г абсолютно сухой почвы.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г навески определяют по следующей формуле:

$$A = \frac{b \cdot v \cdot g}{d},$$

где А – количество КОЕ в 1 г исследуемого образца;

б – количество колоний, выросших на чашке Петри, вокруг которых образовались зоны растворения;

в – количество капель в 1 мл (20);

г – разведение, из которого сделан посев;

д – навеска, г.

Например, среднее количество колоний в чашке Петри с зонами растворения равно 15, рабочее разведение – 1:100, тогда

$$A = \frac{15 \cdot 20 \cdot 100}{1} = 30\,000 \text{ КОЕ в 1 г субстрата.}$$

Микроскопическое исследование. Из колоний грязно-белого цвета *Bac. megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-512 контрольного посева на среду Менкиной готовят фиксированный препарат, окрашивают по Граму. На препарате отмечают крупные спорообразующие па-

лочки, образующие эндоспоры, грамположительные, соединенные парно и в виде коротких цепочек. Результаты наблюдений зарисовывают в тетрадь.

Дают характеристику морфологических и физиологобиохимических признаков микроорганизмов.

Лабораторная работа №11. Микробиологический способ определения обеспеченности растений почвенным фосфором

Цель работы – освоить микробиологический метод определения доступных растениям форм фосфора.

Оборудование и материалы: готовая питательная среда, колбы Эрленмейера, плесневый гриб *Aspergillus niger*, образцы почв, весы.

В настоящее время микробиологические методы используются ограниченно, хотя предлагаемый способ является несложным и весьма доступным. Для определения доступных запасов фосфора в почве используется гриб *Aspergillus niger*.

Сущность данного метода заключается в том, что этот гриб, развиваясь в растворе без фосфорнокислых солей, всю потребность в фосфоре покрывает за счет соединений, содержащихся в почве. *Aspergillus niger* усваивает не только водорастворимые формы соединений, но и те, которые растворяются кислотой, продуцируемой им самим из сахарозы, входящей в питательную среду.

Для проведения занятий используют образцы пахотных почв земледельческой части Красноярского края с различным содержанием соединений фосфора.

Задание 1. В колбы Эрленмейера объемом 100 мл с 5 г воздушно-сухой почвы, предварительно простерилизованной при 120°C 30 мин в автоклаве, приливают 30 мл стерильной питательной среды следующего состава, г/л:

сахароза – 10,0;
MgSO₄ – 0,05;
аммоний виннокислый – 1,5;
MnSO₄ – 0,001;
FeSO₄ – 0,001;
KCl – 0,1;
pH – 4,8-5,0.

Заражают культурой гриба *Aspergillus niger* и инкубируют 7-9 дней при температуре 30°C. По истечении срока инкубации проводят качественную оценку обеспеченности почвы соединениями фосфора, доступными растениями, сравнивая биомассу мицелия *Aspergillus niger* в колбах с анализируемыми почвами. Дают характеристику исследованных почв.

Для количественного определения содержания соединений фосфора, доступных растениям в исследуемых почвах, поступают следующим образом. Культуру гриба убивают (нагреванием при 100°C 10 мин), извлекают крючком пленку гриба, отмывают струей водопроводной воды, высушивают до постоянного веса. Взвешивают урожай мицелия *Aspergillus niger*, выращенного на анализируемой почве, и по калибровочной кривой находят значения количества фосфора, соответствующие данному урожаю мицелия.

Калибровочная кривая готовится с использованием питательных сред, содержащих известное количество фосфора.

В случае использования образца «стандартной» почвы с известным содержанием доступных запасов фосфора, сравнивают вес сухих пленок, выросших на этой и анализируемых почвах.

Пример расчета. На стандартной почве, содержащей 6 мг P_2O_5 в 100 г, выросла пленка весом 0,2 г, а на анализируемой – 0,15 г, для определения количества P_2O_5 в 100 г анализируемой почвы составляют пропорцию:

$$\begin{array}{l} 6 \text{ мг } P_2O_5 \text{ на } 100 \text{ г почвы} - 0,2 \text{ г} \\ X \text{ мг } P_2O_5 \text{ на } 100 \text{ г почвы} - 0,15 \text{ г} \end{array}$$

$$X = \frac{6 \cdot 0,15}{0,2} = 4,5 \text{ мг } P_2O_5 \text{ на } 100 \text{ г анализируемой почвы.}$$

Результаты проведенных исследований пахотных почв земледельческой части Красноярского края оформляют в виде выводов.

Вопросы для самоподготовки

1. В виде каких соединений фосфор встречается в почве?
2. Какие микроорганизмы участвуют в расщеплении органических соединений фосфора?
3. Как микроорганизмы участвуют в превращении минерального фосфора?

4. При каком соотношении углерода и фосфора в почве идет процесс минерализации фосфора? Иммобилизации фосфора?

5. Какова роль эндомикоризных грибов в снабжении растений фосфором? Какими элементами питания растение снабжается дополнительно благодаря наличию эндомикоризы?

6. На корнях каких сельскохозяйственных растений развивается эндомикориза?

7. Сущность микробиологического метода определения нужды растений в фосфорных удобрениях. Культура какого микроорганизма используется для проведения данного исследования?

МОДУЛЬ 4 БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА, ПРОЦЕССОВ ПЕРЕРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ

Лабораторная работа № 12. Микробиологическая оценка качества зерна

Цель работы – изучить микроорганизмы зерна и характеристику условий его хранения.

Оборудование и материалы: чашки Петри со стерильным МПА, стерильная вода, образцы зерна.

Эпифитные микроорганизмы оказывают влияние на зерно в зависимости от условия хранения.

При хранении зрелого зерна, в котором вода находится в связанном состоянии и не доступна микроорганизмам, эпифитная микрофлора находится в состоянии анабиоза (покоя). Поэтому правильное хранение зерна должно сводиться к тому, чтобы не допускать развитие на нем микроорганизмов.

На зерне повышенной влажности микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура. Таким образом, развитие микробиологических процессов в хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к смене доминирующих форм микроорганизмов, изменению видового состава эпифитной микрофлоры. По видовому составу микроорганизмов можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко этот процесс зашел.

Большое количество спорообразующих микроорганизмов р. *Bacillus* и грибов родов *Penicillium* и *Aspergillus* указывает на потерю

всхожести семян. Для микробиологического анализа используют зерно различных сельскохозяйственных культур, возделываемых в земельческой части Красноярского края.

Задание 1. Навеску зерна массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды. Взбалтывают колбу в течение 10 мин. Из полученной вытяжки готовят последовательные разведения (1:10, 1:100, 1:1000 и т.д.). Затем делают посев в чашки Петри со стерильной питательной средой (по капле из каждого разведения в 5-кратной повторности). Чашки инкубируют при температуре 30°C. Учет проводят через 5-7 дней.

Учет. Подсчитывают для каждого образца число колониеобразующих единиц (КОЕ) одновременно на 5 чашках и пересчитывают на 1 г зерна по формуле

$$A = \frac{b \cdot v \cdot g}{d},$$

где А – количество КОЕ в 1 г сырого образца;

б – среднее количество колоний на одной чашке;

в – разведение, из которого сделан посев;

г – количество капель в 1 мл;

д – вес анализируемого образца.

Для определения качественного состава микрофлоры зерна отбирают доминирующие на чашках Петри колонии микроорганизмов и описывают их морфологические и культуральные признаки (см. лаб. работу № 7), данные заносят в таблицу.

Количество колоний на чашке	Культуральные признаки	Морфологические признаки (форма клетки, окраска по Граму)	Название микроорганизма

На основании микробиологического анализа сделать заключение о качестве зерна.

В посевах **свежего доброкачественного зерна** выделяют:

- *Pseudomonas herbicola* – образуют блестящие оранжевые колонии
 - *Pseudomonas fluorescens* – желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии
 - непигментированные колонии неспорообразующих палочек
 - дрожжи – блестящие выпуклые колонии, окрашенные в розовые тона
- } 80%
} 20%

На *несвежем зерне*, хранившемся в условиях повышенной влажности, выделяются:

- микрококки, образующие мелкие, белые, блестящие, плоские колонии;
- спорообразующие палочки, образующие морщинистые, матовые колонии;
- актиномицеты;
- грибы, главным образом р. *Penicillium*, *Aspergillus*.

Лабораторная работа №13. Микробиологическая оценка качества силоса

Цель работы – изучить микроорганизмы, участвующие в консервировании зеленого корма, микробиологическая оценка качества силоса.

Оборудование и материалы: образцы силоса и сенажа.

При силосовании кормов первостепенную роль играют молочнокислые микроорганизмы, входящие в состав эпифитной микрофлоры силосуемых растений.

Состав групп микроорганизмов силосуемой массы приводится в таблице.

Характеристика эпифитного микробоценоза силосуемой массы (средние данные)

Группа микроорганизмов	Видовая принадлежность	Относительное содержание, %
• Гнилостные	<i>Pseudomonas herbicola</i>	80
• Молочнокислые	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10
• Спорообразующие	В том числе <i>Lactobacterium plantarum</i>	
• Группа кишечной палочки	<i>Bacillus</i>	2
• Актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи	<i>E. coli</i>	2
		5–6

Поскольку в основе силосования кормов лежит молочнокислое брожение, следовательно, необходимым является создание анаэробных условий, благоприятных для развития молочнокислых бактерий, входящих в состав эпифитного микробоценоза. Такие условия создаются за счет уплотнения, а в процессе силосования выделяют 3 стадии:

1. Развитие смешанной микрофлоры (до уплотнения).
2. Развитие молочнокислых микроорганизмов, сопровождающееся накоплением молочной кислоты (консерванта) и изменением рН среды до 4,0-4,2. Гнилостные микроорганизмы погибают.
3. Стадия консервирования. Через 2 недели микробиологические процессы в основном заканчиваются.

Задание 1. Микробиологическое исследование микрофлоры силоса рекомендуется проводить не позднее суток после взятия пробы. Для приготовления препарата взять пинцетом силос и плотно прижать между двумя предметными стеклами, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат высушить на воздухе, зафиксировать в пламени спиртовки и окрасить метиленовым синим (3-5 мин). Микроскопировать с масляной иммерсионной системой и зарисовать микроскопическую картину.

Микроскопическая картина на препарате силоса хорошего качества:

- молочнокислые бактерии;
- молочнокислые стрептококки.

Микроскопическая картина на препарате силоса плохого качества:

- спорообразующие маслянокислые бактерии;
- спорообразующие аэробные гнилостные бактерии;
- плесневые грибы.

Результаты проведенных исследований оформить в виде выводов.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое эпифитные микроорганизмы?
2. Что является источником формирования эпифитной микрофлоры?
3. Что является источником питания для эпифитных микроорганизмов?
4. Каково значение эпифитных микроорганизмов в жизни высших растений?
5. Чем обусловлена порча зерна при хранении во влажных условиях?

6. Как с помощью микробиологического анализа дать оценку качества зерна?
7. Какой метод положен в основу выделения эпифитных микроорганизмов. В чем он заключается?
8. Какой микробиологический процесс лежит в основе силосования кормов? Роль эпифитных микроорганизмов силосуемых растений при заготовке силоса?
9. Как на основании микробиологического анализа дать оценку качества силоса?

Лабораторная работа № 14. Дрожжевание кормов

Цель работы – провести дрожжевание корма и определить его качество.

Оборудование и материалы: свекла свежая, отруби, закваска дрожжей пекарских, весы.

В кормовой рацион сельскохозяйственных животных вводят или сухие дрожжи, или дрожжеванные корма, поскольку дрожжи содержат легкопереваримый белок, эргостерин, переходящий в витамин Д, витамины А, В, Е.

Дрожжеванные корма имеют приятно кислый вкус, возбуждают у животных аппетит, предупреждают рахит молодняка, устраняют паратифозные и другие инфекции, благоприятно влияют на продукцию молока у коров, яйценоскость кур, рост и развитие животных.

Дрожжеванию подвергаются богатые моно- и дисахаридами корнеплоды, иначе дрожжи и молочнокислые бактерии (эпифиты) развиваться не будут.

Задание 1. Свеклу, нарезанную мелкими кусочками, вносят в химический стакан емкостью 100 мл, увлажняют при использовании отрубей до консистенции густой сметаны. Стаканы с кормом взвешивают. Масса увлажненного корма должна быть около 100 г. Добавляют 5 мл на 100 г корма однодневной разводки пекарских дрожжей на сусле (закваска). Корм тщательно перемешивают стеклянной палочкой, стакан накрывают бумажной этикеткой, на которой записывают массу стакана и массу увлажненного корма (без закваски). Оставляют при комнатной температуре, систематически перемешивают содержимое стакана на 1-2 или (для сравнения) 3-4 дня. В первом случае в растительной массе развиваются дрожжи, во втором – наряду с дрожжами –

бактерии, плесневые грибы. Если анализ не проводят в указанные сроки, стаканы с кормом ставят в холодильник.

Учет. Определение количества дрожжевых клеток в 1 г корма до дрожжевания. На предметном стекле карандашом отметить квадрат, площадью 4 см.

В него поместить 1 петлю (0,01 мл) дрожжевой закваски и 1 петлю молока и размазать по всей площади квадрата.

Препарат высушить на воздухе, зафиксировать в пламени спиртовки и окрасить метиленовым синим в течение 10 мин.

Используя иммерсионную систему, подсчитать под микроскопом количество дрожжевых клеток в 10 полях зрения.

Для расчетов использовать формулу

$$X_1 = A_1 \cdot \frac{S}{S_1} \cdot 5,$$

где X_1 – количество дрожжевых клеток в 1 г корма до дрожжевания;

A_1 – среднее количество дрожжевых клеток в 1 поле зрения;

S – площадь квадрата (4 см² или 400 мм²);

S_1 – площадь поля зрения (0,02 мм²), поскольку $S_1 = \pi r^2$, т.е. $S_1 = 3,14 \cdot 0,0064 = 0,02$ мм², r – радиус иммерсионного объектива – 0,08 мм.

Определение количества дрожжевых клеток в корме после дрожжевания

Из дрожжеванной массы взять 10 г, внести в колбу с 90 мл стерильной воды и взболтать в течение 5 мин. Затем на площади 4 см² предметного стекла размазать 1 петлю (0,01 мл) + 1 петлю молока. Препарат высушить на воздухе, зафиксировать в пламени спиртовки и окрасить метиленовым синим в течение 10 мин. Подсчитать количество дрожжевых клеток в 10 полях зрения. Среднее количество клеток в одном поле зрения пересчитать на 1 г корма по формуле

$$X_2 = A_2 \cdot \frac{S}{S_1} \cdot 1000,$$

где X_2 – количество дрожжевых клеток в 1 г корма после дрожжевания;

A_2 – среднее количество дрожжевых клеток в 1 поле зрения;

S – площадь квадрата (4 см² или 400 мм²);

S_1 – площадь поля зрения (0,02 мм²), поскольку $S_1 = \pi r^2$, т.е. $S_1 = 3,14 \cdot 0,0064 = 0,02$ мм², r – радиус иммерсионного объектива – 0,08 мм.

Для того чтобы узнать, во сколько раз увеличилось количество дрожжей в процессе дрожжевания корма, число дрожжей в 1 г корма после окончания дрожжевания делят на число дрожжевых клеток, содержащихся в 1 г корма до дрожжевания.

$$N = \frac{X_2}{X_1} .$$

О качестве корма можно судить по наличию бактерий в нем. Если в одном поле зрения встречается до 10 бактериальных клеток (не дрожжей), корм считается хорошим, а если больше 10 – плохим.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие корма используются для дрожжевания?
2. Каким образом дрожжеванные корма влияют на физиологическое состояние сельскохозяйственных животных?
3. Как провести дрожжевание в лабораторных условиях?
4. Как определить количество дрожжевых клеток в закваске методом прямого счета под микроскопом?
5. Как определить количество дрожжевых клеток в корме?
6. Как определить качество дрожжевого корма?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Госманов Р.Г. Микробиология / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова, А.К. Галиуллин. – СПб.: Лань, 2013.
2. Громовых Т.И. Методы выделения, изучения и культивирования микроорганизмов / Т.И. Громовых [и др.]. – Красноярск: Изд-во СибГТУ, 2002. – 150 с.
3. Емцев В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Агропромиздат, 2003. – 383 с.
4. Коростелёва Л.А. Основы экологии микроорганизмов / Л.А. Коростелёва, А.Г. Кощачев. – СПб.: Лань, 2013.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 245 с.
6. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия / Е.Н. Мишустин. – М.: Наука, 1972. – 342 с.
7. Наплекова Н.Н. Метаболиты аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов и их роль в почвах / Н.Н. Наплекова; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2010.
8. Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы / Л.Г. Переведенцева. – СПб.: Лань, 2012.
9. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 180 с.
10. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 169 с.
11. Шильникова В.К. Микробиология / В.К. Шильникова, А.А. Ванькова. – М.: Дрофа, 2004. – 265 с.
12. Шильникова В.К. Микробиология / В.К. Шильникова, А.А. Ванькова, Г.В. Годова. – М.: Дрофа, 2006.

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Лабораторный практикум
с элементами исследовательской работы*

Боер Ирина Владимировна

Редактор И.Н. Крицына

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 25.04.2017. Формат 60×90/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. 3,75. Тираж 75 экз. Заказ № 107

Редакционно-издательский центр Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117