

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В.В. Евсеев

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебное пособие

В.В. Евсеев

Курганский
государственный
университет



редакционно-издательский
центр
43-38-36

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное агентство по образованию
Курганский государственный университет

В.В. Евсеев

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебное пособие

Курган 2008

УДК 579. 26 (075.8)
ББК 28.4я73
Е 25

Рецензенты

д-р биол. наук, проф. С.Н. Гашев
(зав. кафедрой зоологии и ихтиологии ТюмГУ)

д-р с. – х. наук, проф. А.П. Голощанов
(зав. кафедрой ТХППР Курганской ГСХА им. Т.С. Мальцева)

канд. с. – х. наук, доц. А.В. Созинов
(кафедра почвоведения и агрохимии Курганской ГСХА им. Т.С. Мальцева)

Печатается по решению методического совета
Курганского государственного университета

Евсеев В.В.

Е25 Лабораторный практикум по экологии микроорганизмов:
Учебное пособие.– Курган: Изд-во КГУ, 2008. – 128 с.

В лабораторный практикум наряду с традиционными темами по изучению морфологии и физиологии микроорганизмов включены задания, направленные на освоение студентами специальных методов определения численности, видового состава, характера взаимоотношений микроорганизмов в объектах окружающей среды. Значительное внимание уделено микробиологическому анализу почвы, воды, воздуха, филлосферы растений. Рассматривается роль микроорганизмов в круговороте веществ в биосфере.

Лабораторный практикум по экологии микроорганизмов предназначен для студентов вузов, обучающихся по специальности 020801 - «Экология».

УДК 579. 26 (075.8)
ББК 28.4 я73

ISBN

© Курганский государственный
университет, 2008
© В.В. Евсеев, 2008

Содержание

| | |
|-------------------|---|
| Предисловие | 5 |
|-------------------|---|

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Занятие 1. Микробиологическая лаборатория.

| | |
|---|---|
| Устройство микроскопа. Методы микроскопии | 6 |
|---|---|

Занятие 2. Морфология бактерий и актиномицетов.

| | |
|--|----|
| Методы приготовления микробиологических препаратов | 15 |
|--|----|

Занятие 3. Морфология цианобактерий, микроводорослей

| | |
|--------------------|----|
| и простейших | 26 |
|--------------------|----|

Занятие 4. Морфология микромицетов и дрожжей.

| | |
|----------------------------|----|
| Классификация грибов | 32 |
|----------------------------|----|

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Занятие 5. Методы культивирования

| | |
|--|----|
| микроорганизмов. Микробиологическая аппаратура | 39 |
|--|----|

Занятие 6. Количественный учет микроорганизмов

| | |
|-------------------------------|----|
| в почве, воде и воздухе | 46 |
|-------------------------------|----|

Занятие 7. Микробиологический анализ состояния почвы,

| | |
|--|----|
| воды и воздуха. Выделение чистых культур микроорганизмов | 51 |
|--|----|

Занятие 8. Идентификация чистой культуры бактерий.

| | |
|--|----|
| Дифференциально-диагностические методы окраски | 57 |
|--|----|

Занятие 9. Экофизиология бактерий. Влияние факторов среды

| | |
|-------------------------|----|
| на микроорганизмы | 62 |
|-------------------------|----|

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБОЦЕНОЗОВ

Занятие 10. Экологические методы изучения почвенных

| | |
|--|----|
| микробоценозов на основе стеклотехники | 70 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Занятие 11. Методы оценки биологической активности почвы | 75 |
| Занятие 12. Биотические взаимоотношения микроорганизмов | 81 |
| Занятие 13. Микрофлора филлосферы растений | 87 |

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ В БИОСФЕРЕ

| | |
|--|-----|
| Занятие 14. Микроорганизмы, участвующие в круговороте углерода в природе | 94 |
| Занятие 15. Аммонификация белковых веществ и мочевины | 100 |
| Занятие 16. Процессы нитрификации и денитрификации | 107 |
| Занятие 17. Азотфиксирующие бактерии | 111 |
| Занятие 18. Превращения микроорганизмами соединений фосфора, серы и железа | 118 |
| Список литературы | 125 |
| Приложение | 126 |

Предисловие

Лабораторный практикум по экологии микроорганизмов предназначен для студентов вузов, обучающихся на дневном отделении по специальности «Экология» (020801).

Учебное пособие подготовлено в соответствии с требованиями государственного образовательного стандарта, учебным планом указанной специальности и рабочей программой курса.

Практикум рассчитан на 18 занятий. В связи с тем, что студенты данной специальности не имеют микробиологической подготовки, а практические занятия по микробиологии являются основой получения навыков работы с микроорганизмами, в настоящий практикум включены лабораторные работы, знакомящие студентов со спецификой микробиологической лаборатории и базовыми методами исследования микроорганизмов.

Задачами пособия являются:

- изучение строения бактерий и микроскопических эукариот, основной микробиологической техники и аппаратуры;
- ознакомление с методами выделения чистых культур микроорганизмов и определения их биологических свойств;
- изучение отношения микроорганизмов к факторам окружающей среды, типов трофических, конкурентных и иных взаимодействий в микробном сообществе;
- изучение характерных особенностей микробного сообщества почвы, воды, поверхности растений, роли микроорганизмов в превращении биогенных элементов;
- овладение приемами выделения и учета микроорганизмов различных физиологических групп в объектах окружающей среды, в том числе специальными экологическими методами изучения почвенных микроорганизмов.

Учебное пособие может быть использовано для самостоятельной работы студентов при подготовке к занятиям. Описание каждой лабораторной работы содержит цель занятия, план его проведения, краткие пояснения к занятию, перечень самостоятельных заданий для студентов, методические указания к их выполнению. Для проверки усвоения материала после каждой работы приведены контрольные вопросы.

Подготовка студентов к занятиям предусматривает использование учебных пособий «Экология микроорганизмов» (А.И. Нетрусов и др., 2004), «Лабораторный практикум по общей микробиологии» (Н.Б. Градова и др., 2004), «Практикум по микробиологии» (Е.З. Теппер и др., 1993) и настоящего практикума.

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы – невидимые невооруженным глазом одно- и многоклеточные живые организмы (бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие), а также неклеточные формы жизни (вирусы и фаги).

Морфологическими признаками микробов являются форма клетки, внутриклеточное строение, способность к движению, способы размножения. Морфология микроорганизмов изучается в лабораториях и непосредственно в природной обстановке в диагностических целях и для оценки биологического разнообразия экосистем.

На занятиях данного раздела рассматриваются методы изучения морфологии бактерий, актиномицетов, водорослей, мицелиальных грибов и дрожжей – наиболее распространенной микрофлоры различных объектов окружающей среды.

Занятие 1. Микробиологическая лаборатория. Устройство микроскопа. Методы микроскопии

Цель занятия. Ознакомиться с микробиологической лабораторией, правилами безопасной работы в ней; освоение техники и методов микроскопии микробиологических препаратов.

План занятия. 1. Ознакомление с организацией микробиологической лаборатории и правилами работы в ней.

2. Изучение устройства микроскопа и особенностей работы с иммерсионной системой.

3. Ознакомление с методами микроскопии: светлопольной, интерференционной, люминесцентной.

4. Самостоятельная работа: микроскопия демонстрационных препаратов.

Оборудование и материалы. Микроскопы. Салфетки для снятия пыли и масла с иммерсионного объектива. Иммерсионное масло. Банки с ватой. Чашки сливные, мостики. Демонстрационные препараты микробов. Таблица: правила безопасной работы в микробиологической лаборатории; схемы устройства биологических микроскопов.

Пояснения к занятию

Микробиологическая лаборатория

Для изучения микроорганизмов используют различные методы. Основными методами являются: микроскопический – исследование морфологических особенностей микроорганизмов с помощью специальных оптических приборов; микробиологический – выращивание микробов в лабораторных условиях и изучение их жизнедеятельности; биологический – изучение действия микробов на различные живые организмы.

Исследования микроорганизмов осуществляются в специально оборудованном помещении, которое называется микробиологической лабораторией. Помещение лаборатории должно быть изолировано от жилых комнат и пищевых блоков. В состав микробиологической лаборатории входят лабораторные комнаты для исследования, а также подсобные помещения для подготовки питательных сред (средоварочная комната), мытья посуды (моечная), стерилизации (автоклавная). Комната, где проводятся все бактериологические исследования, должна быть светлой и просторной. Стены здесь до высоты 170 см от поверхности пола окрашивают в светлые тона масляной краской. Пол покрывают линолеумом. Такое покрытие позволяет использовать при уборке помещения дезинфицирующие растворы. Обязательно в этой комнате устанавливают раковину с водопроводной водой. Целесообразно выделить дополнительную комнату – бокс. Это небольшое изолированное застекленное помещение площадью 3 – 5 м², которое имеет предбоксы и предназначено для выполнения микробиологических работ в асептических условиях. Вход в основное, рабочее помещение бокса осуществляется через тамбур с раздвижной дверью, исключая резкое перемещение воздуха и занесение извне посторонней микрофлоры. Оборудование бокса состоит из стола с легко моющейся поверхностью (пластик), бактерицидной лампы, укрепленной на стене или потолке бокса. Все оборудование бокса, его стены, пол периодически моют и протирают дезинфицирующими растворами. Перед работой бокс обязательно облучают в течение 40 мин ультрафиолетовыми лучами бактерицидной лампы.

К основному оборудованию лаборатории относятся микроскопы, термостаты для выращивания микроорганизмов, автоклав и другие приборы для стерилизации сред и посуды, дистилляторы, холодильники. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, красителями, реактивами и другими лабораторными материалами.

Работа в микробиологической лаборатории должна осуществляться в условиях близких к стерильным. Выполнение микробиологических работ должно обеспечить предупреждение загрязнения внешней среды и персонала клетками микроорганизмов из исследуемого материала (почва, вода, растения и др.), среди которых могут оказаться патогенные (болезнетворные) формы. Даже обычные сапротрофные виды микробов содержат в составе своих клеток чужеродные для человека белковые вещества – антигены, способные при попадании в организм вызвать непредсказуемые реакции, в частности, аллергические.

Не менее важной задачей является предупреждение загрязнения чистых культур микроорганизмов, выделенных и хранящихся в лаборатории, посторонними микроорганизмами из внешней среды.

В учебной микробиологической лаборатории каждый студент должен иметь постоянное рабочее место. Рабочее место оборудуется всем необходимым для занятий: биологическим микроскопом с осветителем, штативом для пробирок, набором красителей и реактивов в капельницах, колбой с водой и ванночкой для окраски препаратов, источником огня (спиртовка). На столе должен быть набор предметных стекол, бактериологическая петля и обязатель-

но сосуд с дезинфицирующим раствором (хлорамин, 5%-й раствор фенола). Преподаватель ведет журнал учета ознакомления студентов с правилами техники безопасности при работе в лаборатории.

Правила и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Заходить и работать в лаборатории только в халате. Халат должен быть застегнут наглухо.
2. Работать на одном и том же месте и пользоваться закрепленным оборудованием. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов (в том числе портфелей, сумок).
3. Соблюдать чистоту и опрятность при работе. Длинные волосы должны быть подобраны, во избежание их попадания в пламя горелки.
4. В лаборатории нельзя курить, пить и принимать пищу.
5. Все предметы, использованные в работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени, либо погружением в дезинфицирующие растворы.
6. Во избежание взрыва не зажигать одну спиртовку от другой.
7. Не соприкасаться металлическими предметами с проводами и контактными частями электросети. Обо всех повреждениях сообщать преподавателю.
8. Соблюдать правила обращения с химическими и другими реактивами.
9. По окончании занятий рабочее место привести в порядок.
10. Уходя из лаборатории, вымыть руки.

Во время работы необходимо бережно обращаться с микроскопом и другими предметами лабораторного оборудования. По ходу работы вести записи и делать зарисовки микроскопической картины в альбоме. По окончании работы следует получить зачет по теме (ответить на контрольные вопросы) и подписать у преподавателя протокол исследования.

Устройство микроскопа

Биологический иммерсионный микроскоп – это оптический прибор, позволяющий получить действительное, увеличенное, обратное изображение предмета в проходящем свете. Современными моделями биологического иммерсионного микроскопа являются микроскопы серии «Биолам» или «Микмед» (рис. 1).

В микроскопе различают две части – механическую и оптическую.

Механическая часть состоит из основания (опорной части) микроскопа, тубусодержателя, на котором укреплены предметный столик, кронштейн конденсора, макро- и микровинты, а в верхней части - тубуса (под окуляр) и револьвера (для объективов).

Предметный столик служит для закрепления на нем рассматриваемого препарата. Столик может перемещаться в горизонтальной плоскости с помощью винтов в двух взаимно перпендикулярных направлениях, что позволяет исследовать разные участки препарата. Бывают неподвижные столики с препаратоводителем.

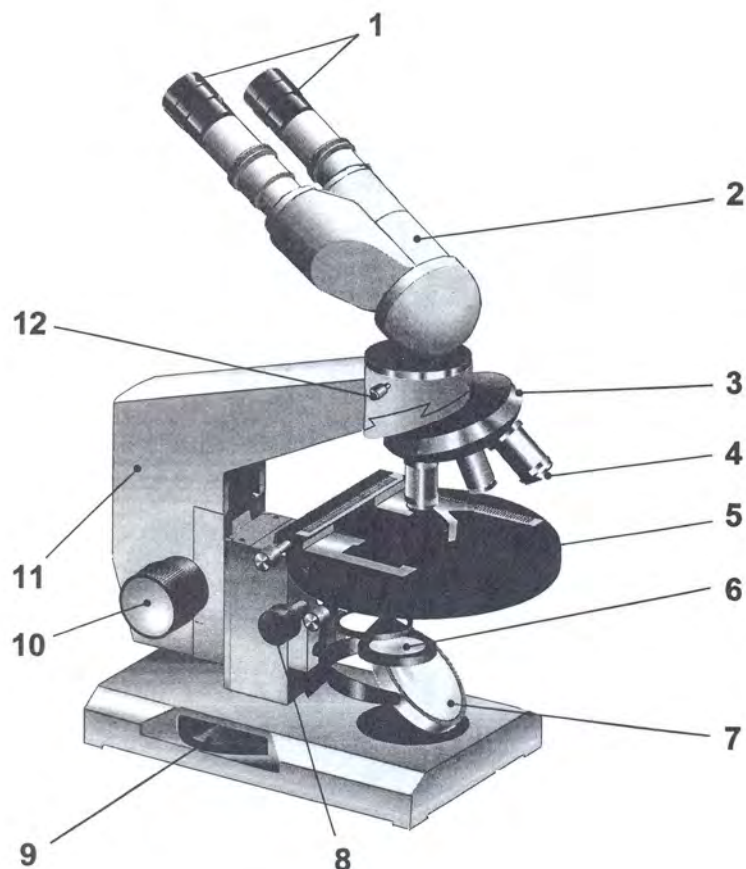


Рис. 1. Микроскоп для морфологических исследований «МИКМЕД-1»:

1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – револьвер; 4 – объектив; 5 - предметный столик; 6 – конденсор Аббе; 7 – зеркало; 8 – рукоятка перемещения конденсора; 9 – рукоятка тонкой фокусировки; 10 – макровинт; 11 - тубусодержатель; 12 - винт крепления насадки

Фокусировка осуществляется путем перемещения тубуса двумя винтами – макрометрическим (грубая фокусировка) и микрометрическим (тонкая фокусировка). При вращении винтов по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Оптическая часть микроскопа включает две системы: осветительную (зеркало, конденсор с ирисовой диафрагмой и откидной линзой) и наблюдательную (объектив и окуляр). Зеркало имеет две отражающие поверхности – плоскую и вогнутую. Как правило, зеркало должно быть повернуто к свету плоской стороной; вогнутой поверхностью зеркало повертывают редко – при работе без конденсора с объективами малых увеличений.

Конденсор состоит из двух линз в оправе, которые собирают параллельные лучи света, отраженные от зеркала, в пучок в плоскости препарата. Конденсор укреплен на кронштейне, может перемещаться с помощью управляющего винта, снабжен ирисовой диафрагмой, которая предназначена для регулирования интенсивности освещения препарата.

Объектив – это основная оптическая часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния передней (фронтальной) линзы. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. В биологических микроскопах типа «Биолам» применяются объективы, дающие увеличение в 8^{\times} , 20^{\times} , 40^{\times} и 90^{\times} раз.

Объективы малого и среднего увеличения (сухие) применяют для предварительного просмотра препарата и изучения крупных клеток микроорганизмов. Эти объективы называют сухими, так как при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух.

Мощные короткофокусные объективы (90^{\times}) называются иммерсионными. При работе с ними препарат должен быть максимально освещен. Светорассеяние, неизбежное при работе с сухими объективами (из-за разницы показателей преломления световых лучей воздухом и стеклом), в данном случае устраняется благодаря использованию иммерсионных жидкостей, показатель преломления которых близок к показателю преломления стекла.

Каплю жидкости наносят на препарат и погружают в нее объектив. При работе с объективом 90^{\times} используют кедровое масло, благодаря которому поток световых лучей от осветителя не изменяет своего направления, не рассеивается, и попадает направленным пучком в объектив микроскопа, чем и достигается лучшее освещение объектов исследования.

Окуляры микроскопа имеют две линзы – глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляр увеличивает изображение, данное объективом. Микроскопы системы «Биолам» снабжены окулярами, дающими увеличение 7^{\times} , 10^{\times} и 15^{\times} .

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Однако современные микроскопы, особенно для научных исследований, ценятся не за увеличение, а за разрешающую способность, которую они могут обеспечить. Разрешающая способность определяет отчетливость получаемого изображения и реализуется только при определенном увеличении, которое называют полезным. Полезное увеличение микроскопа находят по формуле:

$$V_{\text{полезное}} = (500 \div 1000) A,$$

где A – апертура объектива – величина, определяющая способность оптической системы воспринимать то или иное количество света (значение апертуры указывают на оправе объектива).

Расчеты показывают, что полезное увеличение не может превышать 1300 – 1500 раз. Большее увеличение не выявляет новых деталей на изображении, а

освещенность его уменьшается. Иммерсионная система значительно повышает разрешающую способность микроскопа.

Техника использования микроскопа с иммерсионной системой: на препарат наносят каплю иммерсионного масла (желательно иммергировать и верхнюю линзу конденсора) и помещают препарат на предметный столик микроскопа. Установив предварительно освещение, включают поворотом револьвера микроскопа иммерсионный объектив (90^\times , с маркировкой на оправе «МИ» и черной кольцевой канавкой). Наклонив голову вбок (*в окуляр микроскопа при этом не смотрят!*), тубус микроскопа макровинтами осторожно опускают вниз до тех пор, пока фронтальная линза иммерсионного объектива не соприкоснется с каплей кедрового масла. Далее, глядя в окуляр микроскопа, очень медленно опускают тубус до появления изображения клеток микроорганизмов на препарате, используя с большой предосторожностью *макрометрические* винты. И только после того, как объекты найдены, добиваются четкого и ясного их изображения с помощью *микрометрических* винтов.

Возможен и другой подход, когда фронтальную линзу погружают в каплю масла, и наводку на резкость выполняют путем поднимания объектива, а не опускания его. Такой прием позволяет избежать случайного раздавливания препарата и повреждения фронтальной линзы в результате слишком поспешного и неосторожного вращения макровинта.

По окончании микроскопирования тубус микроскопа поднимают, снимают со столика микроскопа препарат, переводят микроскоп в нерабочее положение: фронтальную линзу иммерсионного объектива осторожно протирают мягкой фланелевой салфеткой (2 – 3 легких движения для удаления масла), объектив выключают из хода световых лучей поворотом револьвера. Шнур от электрической подсветки аккуратно сворачивают вокруг основания микроскопа и накрывают микроскоп сверху чехлом для предохранения от пыли.

Иммерсионное масло, остающееся на стекле постоянного препарата, удаляют небольшим кусочком ваты, а препарат сдают на хранение преподавателю. В случае работы с временным препаратом предметное стекло по окончании микроскопирования вместе с оставшимся на нем маслом ликвидируют в специальные сосуды для отработанных стекол с дезинфицирующей жидкостью.

Методы микроскопии

Существуют разнообразные методы наблюдения при помощи микроскопа. Здесь будут рассмотрены только наиболее востребованные в работе эколога и доступные методы микроскопии: метод светлого поля, интерференционная и люминесцентная микроскопия.

При микроскопировании объекты исследования подразделяют на: прозрачные и непрозрачные, амплитудные и фазовые. Для разных объектов, обладающих неодинаковой способностью рассеивать свет, применяют свои характерные методы наблюдения.

Метод светлого поля

Метод светлого поля в проходящем свете один из наиболее распространенных и доступных для наблюдения. При прямом освещении им пользуются для изучения прозрачных объектов, у которых различные участки неодинаково поглощают свет. К прозрачным объектам относятся клетки микроорганизмов, растений. В микробиологии методом светлого поля в проходящем свете пользуются для изучения окрашенных препаратов.

Очень важно перед началом микроскопии выполнить настройку освещения. Наиболее равномерное освещение поля зрения с минимальным рассеянием достигается при установке света по *принципу Кёлера*, т.е. так, чтобы апертуры объектива и конденсора соответствовали друг другу. Для этого, вращая рукой револьвер, вводят в ход лучей объектив малого увеличения (8^X) и откидную линзу конденсора (при работе с объективами увеличением более 10 откидная линза конденсора должна быть выведена из хода лучей). Звук щелчка говорит о том, что объектив закреплен на оптической оси. Поднимают рукояткой конденсор до упора вверх и полностью открывают диафрагму конденсора. Зеркало разворачивают плоской стороной к окну или другому источнику света. Следует избегать излишне яркого, ослепляющего освещения. Микроскоп фокусируют на резкое изображение препарата, расположенного на предметном столике. Затем вынимают окуляр из тубуса. Наблюдая в тубус выходной зрачок объектива (наименьший освещенный кружок), наклонами зеркала добиваются равномерного заполнения светом выходного зрачка объектива. Вставить окуляр. Для уменьшения яркости освещаемого поля в откидную рамку конденсора можно установить светофильтр.

Большинство современных микроскопов выпускают с накладными осветителями типа ОИ-32М. Методика настройки освещения в данном случае в основном совпадает с описанной выше, но имеет некоторые особенности. Необходимо установить патрон с лампой в шарнир до упора таким образом, чтобы нить лампы располагалась горизонтально. После фокусирования микроскопа на резкое изображение препарата, перемещают патрон с лампой за рукоятку вдоль оси и разворачивают его вместе с шарниром в горизонтальной плоскости, чтобы добиться наиболее яркого и равномерного освещения поля зрения микроскопа.

Интерференционная микроскопия

При помощи обыкновенного биологического микроскопа можно наблюдать только такие объекты, которые по отношению к окружающей их среде поглощают свет в разной степени. Такие предметы называют амплитудными, так как они вызывают изменение амплитуды проходящего через них света. Однако в природе существуют такие микрообъекты, которые не проявляют никакой разницы в поглощении света. Такие объекты называются фазовыми, так как они вызывают только изменение фазы проходящей световой волны. Почти все

живые клетки прозрачны для видимого света, т.е. световые волны, проходя через клетку, почти не теряют своей интенсивности, хотя фаза их изменяется. Человеческий глаз не способен улавливать фазовые изменения, но реагирует на изменение интенсивности света, т.е. его амплитуды. Чтобы можно было наблюдать фазовые объекты при помощи обыкновенного биологического микроскопа, необходимо их окрасить. Окрашивание препаратов является затруднительным и влечет за собой различные нежелательные явления. Например, нельзя окрашивать живые клетки, так как окрашивание обычно связано с их умерщвлением.

Раньше прозрачные объекты изучали или путем частичного закрытия ирисовой диафрагмы конденсора, что сопровождается потерей разрешающей силы, или путем косо́го освещения. Голландский физик Ф. Цернике (Zernicke, 1932) указал на возможность использования метода фазового контраста для наблюдения прозрачных объектов. Метод основан на выявлении сдвигов фазы световых колебаний. Фазовые изменения, не улавливаемые глазом человека, преобразуют в амплитудные. Слабыми сторонами фазово-контрастных микроскопов являются присущие им дефекты: появление светящегося ореола вокруг объекта, низкая контрастность тесно примыкающих структур, плохое воспроизведение растянутых объектов, ориентированность в основном на качественные, описательные исследования. К методу фазового контраста близок принцип действия интерференционного микроскопа, схему которого для прозрачных объектов предложил в 1930 г. А.А. Лебедев. В этом микроскопе свет сначала делится на два пучка, а затем они воссоединяются. Каждый пучок света после разделения имеет свой путь. Один из них проходит через объект, а другой – мимо него. Луч, проходя через объект, испытывает фазовый сдвиг, который можно измерить. В отличие от фазового контраста в интерференционном микроскопе живая клетка может иметь вид окрашенного препарата вследствие того, что на вторичное изображение объекта накладывается дополнительная световая волна, от взаимодействия с которой получается контрастное и цветное изображение.

Интерференционная микроскопия – один из лучших методов наблюдения прозрачных объектов. Этот метод превосходит известные методы, например окрашивание или фазовый контраст, тем, что дает большие возможности проведения количественных исследований без умерщвления клетки.

Люминесцентная микроскопия

Метод люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии находит широкое применение при изучении экологии микроорганизмов, особенно почвообитающей микрофлоры (водорослей, бактерий, грибов). Люминесцентная микроскопия почвенных монолитов (по Д.Г. Звягинцеву) стала одним из классических экологических методов изучения почвенных микробценозов.

Метод основан на том, что ряд соединений в клетке (хлорофилл и др.) при освещении коротковолновыми лучами (ультрафиолетовыми или синими) способен

светиться желто-зеленым или оранжевым светом на темном фоне. Молекулы объекта после поглощения света переходят в возбужденное состояние, а затем возвращаются в нормальное. Последний процесс сопровождается испусканием квантов света, который теперь имеет не короткую, а гораздо большую длину волны. Процесс испускания света называют люминесценцией. Если свечение прекращается сразу с прекращением возбуждения, то это явление называют флуоресценцией.

Нефлуоресцирующие вещества можно обработать специальными флуорохромами и также наблюдать флуоресценцию, что используется в микроскопии, особенно в работе с живыми объектами.

К флуорохромам относятся: акридин оранжевый, конго красный, нейтральный красный, эритрозин, кислый фуксин и др. Флуорохромы применяют в виде сильно разбавленных водных растворов (1:500 – 1:100000). Такие растворы малотоксичны, что дает возможность изучать живую клетку. Флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками.

Препараты, окрашенные флуорохромами, изучают с использованием специальных нефлуоресцирующих под действием коротковолновых лучей сред, – в воде, глицерине, физиологическом растворе, вазелиновом масле.

Для наблюдения объектов этим методом необходимо иметь: биологический микроскоп; источник возбуждения флуоресцентного света; светофильтры; флуорохромы. Принцип действия флуоресцентного микроскопа не отличается от обычного, но осветительная и наблюдательная системы снабжены специальными светофильтрами. Объективы имеют на корпусе букву «Л». Источником света служат ртутно-кварцевые лампы.

Люминесцентная микроскопия увеличивает контрастность изображения, дает возможность различать отдельные клеточные структуры.

Самостоятельная работа

1. Микроскопия демонстрационных препаратов при большом увеличении (иммерсионный объектив) и их зарисовка в альбом.
2. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Перед работой следует проверить исправность микроскопа (особенно подсветки) и чистоту оптики. Руководствуясь правилами работы с иммерсионной системой микроскопа, просмотреть сначала при малом, а затем большом увеличении демонстрационный препарат. Микроскопическую картину при большом увеличении зарисовать в альбом цветными карандашами, условно обозначив поле зрения кругом. Под рисунком следует указать серию используемого микроскопа, увеличение, способ окраски препарата. Рядом с рисунком дают описание препарата. Например: в поле зрения обнаружены мелкие кокковидные палочки с закругленными концами, а также крупные овальные клетки, окрашенные в красный цвет диффузно.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные правила безопасной работы в микробиологической лаборатории.
2. Опишите устройство биологического иммерсионного микроскопа.
3. Назовите отличительные признаки иммерсионного объектива.
4. Как определяется общее увеличение микроскопа?
5. Каковы правила микроскопии препарата?
6. Назовите известные Вам методы микроскопии, дайте им краткую характеристику.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 6 – 23.
2. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 5 – 27.
3. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 3 – 11.

Занятие 2. Морфология бактерий и актиномицетов. Методы приготовления микробиологических препаратов

Цель занятия. Ознакомиться с морфологией бактерий и актиномицетов, методами ее изучения в прижизненных и фиксированных окрашенных препаратах.

План занятия. 1. Изучить морфологию кокковидных, палочковидных, извитых бактерий и актиномицетов.

2. Ознакомиться с методами исследования микробов в живом состоянии.

3. Изучить методы подготовки фиксированных окрашенных препаратов.

4. Самостоятельная работа: приготовление и окраска фиксированных препаратов бактерий; приготовление прижизненных препаратов почвенных микробов; микроскопия и зарисовка собственного и демонстрационных препаратов.

Оборудование и материалы. Микроскопы. Иммерсионное масло. Банки с ватой. Чашки сливные, мостики. Набор красителей (на столе преподавателя). Фуксин Пфейффера, конго красный. Пробирки с культурой палочковидных микробов (в жидкой среде и на поверхности скошенного агара). Стекла предметные – обычные и с луночкой. Пинцеты. Спиртовки. Бактериальные петли в штативах. Вода в колбах для промывки мазков. Карандаши по стеклу. Тетради для высушивания мазков. Демонстрационные препараты микробов. Таблицы: основные формы микроорганизмов; актиномицеты; схема расположения жгутиков; методика приготовления фиксированного окрашенного препарата (мазка); негативный способ окраски.

Пояснения к занятию

Бактерии и актиномицеты имеют прокариотическое строение клеток. У них нет истинного ядра (вместо него нуклеоид) и многих органелл, характерных для эукариотических (ядерных) клеток. По форме клеток бактерии подразделяют на четыре основные группы: кокковидные (шаровидные), палочковидные, извитые (спиралевидные), нитчатые.

Кокковидные бактерии (от латинского «coccus» – шарик) характеризуются отсутствием подвижности и не образуют спор.

Кокки могут быть представлены одиночными клетками (микрочкокки), соединенными попарно (диплококки), по четыре (тетракокки), по восемь-двенадцать-шестнадцать (сарцины), в виде цепочек (стрептококки) или скоплениями в форме виноградной грозди (стафилококки). Группировка клеток зависит от способа деления кокков (рис. 2, 3).

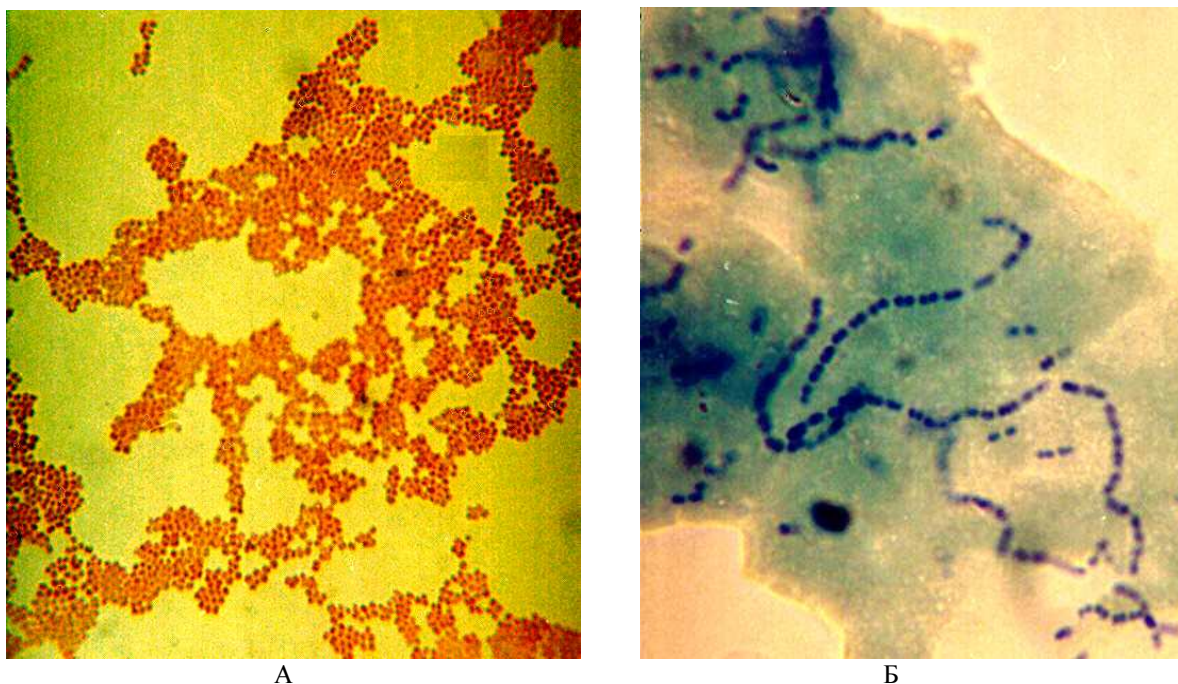


Рис. 2. Сочетания кокков: А - стафилококки, Б - стрептококки.
Об. 90, ок. 10. Оригинал*

Микрочкокки. Образуются делением кокков в разных плоскостях и располагаются беспорядочно.

Стафилококки. Располагаются беспорядочно, но при этом скопление кокков напоминает гроздь винограда (греческое «staphyle» - гроздь винограда).

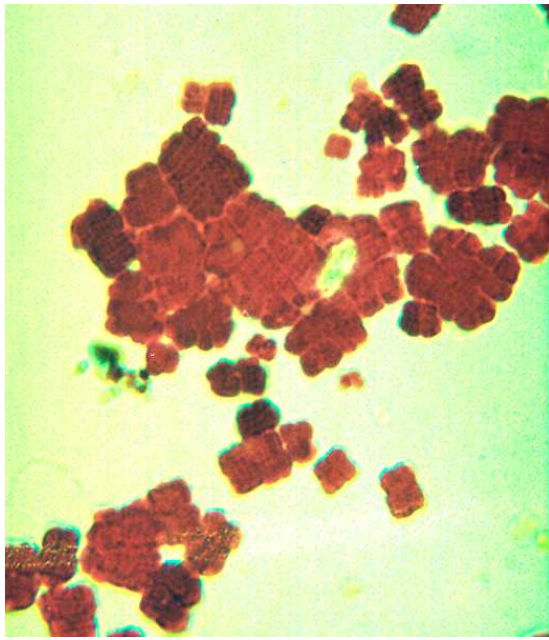
Стрептококки. Образуются делением кокков в одной плоскости, клетки располагаются цепочкой (греческое «streptos» - цепь).

Диплококки. Располагаются попарно, образуются при делении в одной плоскости (греческое «diplos» - удвоенный).

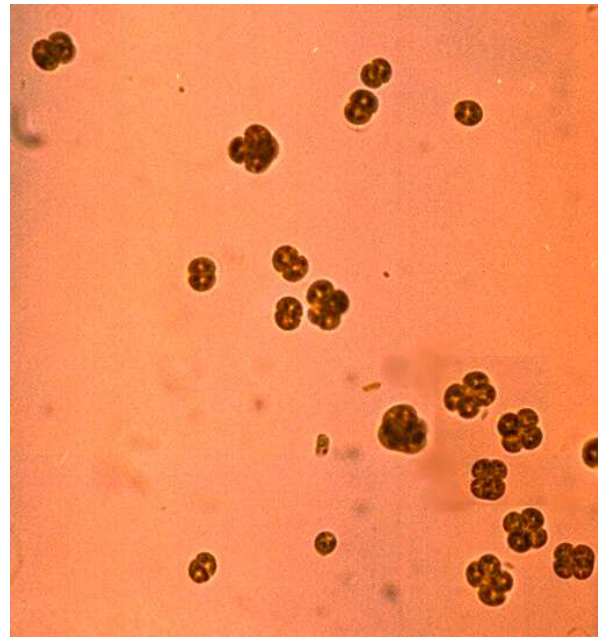
Тетракокки. Располагаются по четыре, такое расположение клеток является результатом деления материнских форм в двух перпендикулярных плоскостях (греческое «tetra» - четыре).

Сарцина. Образуется делением кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, по форме напоминают пакеты, тюки, кубики (латинское «sarcio» - связывать).

* Оригинальные рисунки в практикуме выполнены автором.



А



Б

Рис. 3. Сочетания кокков: А - сарцина, Б – дипло- и тетракокки.
Об. 90, ок. 10. Оригинал

Палочковидные бактерии делятся на две большие группы: бактерии (не образуют спор, род *Bacterium*) и бациллы (палочки, образующие споры, род *Bacillus*). Спорообразующими являются также бактерии рода *Clostridium* (кlostридии) (рис. 4).



Рис. 4. Бациллы (со спорами) и бактерии (без спор)

Споры служат для переживания неблагоприятных условий внешней среды и отличаются повышенной устойчивостью к колебаниям температуры, высушиванию, воздействию химических веществ. Споры формируются внутри клеток, поэтому их называют эндоспорами. У бактерий рода *Bacillus* эндоспоры не меняют форму клетки. У бактерий рода *Clostridium* в процессе спорообразования происходит изменение формы клетки, из палочковидной она превращается в веретеновидную или булавовидную. Иногда наблюдается плектридиальное расположение споры (клетка напоминает барабанную палочку).

У палочковидных бактерий наблюдаются большие колебания в размерах. Палочки бывают короткие, длинные, тонкие и толстые. Концы клеток могут

быть ровными (срезанными), закругленными или заостренными. Если палочки соединяются по две, то они называются диплобактериями или диплобациллами. Клетки, объединенные в цепочки, получили название стрептобактерий или стрептобацилл. Для ряда палочковидных бактерий характерен выраженный *плеоморфизм* (pleon – много, morphe – форма), т.е. способность принимать различные формы. Изменение формы в процессе развития характерно для азотобактера, ризобий, риккетсий, коринебактерий и нокардий. В таких культурах, наряду с палочковидными, встречаются клетки кокковидной, овальной или неправильной формы.

Среди палочковидных форм встречаются подвижные и неподвижные представители. Скорость и характер движения зависят от возраста культуры, окружающей среды и вида бактерий. Хорошо выражена подвижность у молодых клеток, у старых она замедлена или совсем отсутствует. Наличие или отсутствие движения – один из признаков при определении вида микробов.

Органами передвижения являются жгутики, которые осуществляют вращательные движения и по-разному располагаются на микробной клетке (рис. 5).

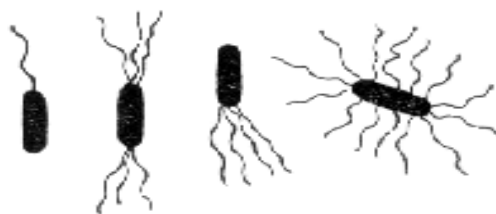


Рис. 5. Расположение жгутиков у бактерий: монотрихи, амфитрихи, лофотрихи, перитрихи

В зависимости от расположения жгутиков все микроорганизмы делят на *монотрихи* – один полярный жгутик, *амфитрихи* – жгутики имеются на обоих концах, по одному или несколько, *лофотрихи* – пучок жгутиков расположен на одном из концов микробной клетки, *перитрихи* – жгутики расположены по всей поверхности клетки. Монотрихи и лофотрихи осуществляют поступательное движение, амфитрихи и перитрихи передвигаются беспорядочно. Наблюдать за подвижностью микробов удобно с использованием препаратов *висячей* или *придавленной капли*.

Извитые формы бактерий. Извитые формы встречаются только в виде одиночных клеток. Их название зависит от числа завитков и степени изогнутости в продольной оси. К этой группе бактерий относятся вибрионы, спириллы и спирохеты (рис. 6, 7).

Вибрионы – слегка изогнутые клетки с одним изгибом, в виде запятой или подковки, изгиб их составляет $\frac{1}{4}$ витка спирали. Вибрионы подвижны, перемещаются за счет жгутика. *Спириллы* отличаются спиральным строением клетки, имеют 2 – 3 изгиба. Подвижны. Жгутики у спирилл расположены биполярно. *Спирохеты* – удлиненные, штопорообразные тонкие клетки с

большим количеством витков спирали. Жгутиков спирохеты не имеют, но подвижны за счет изгибов мягкой клеточной стенки и специальных белковых фибрилл, находящихся под клеточной стенкой. Эндоспоры у извитых форм не обнаружены.



Рис. 6. Извитые формы бактерий: вибрионы, спириллы, спирохеты

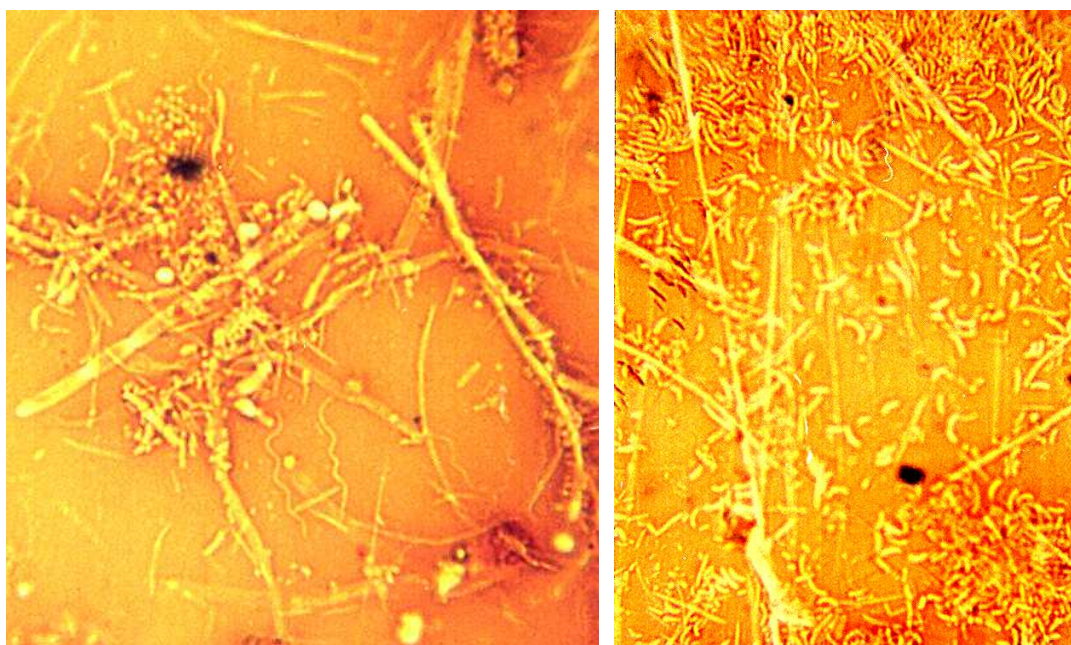


Рис. 7. Извитые формы бактерий в мазках из зубного налета.
Негативный метод окраски. Об. 90, ок. 10. Оригинал

Нитчатые бактерии. Это группа многоклеточных организмов, представляющих собой цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или диско-видных клеток (рис. 8). Нитчатые бактерии встречаются среди представителей различных физиологических групп – серобактерий (род *Beggiatoa*, *Thiothrix*), железобактерий (род *Leptothrix*), цианобактерий. Длина нитей может достигать значительных размеров (до 500 мкм). Нити могут быть прямые, скрученные в спирали, у некоторых форм нити плоские, лентообразные. Нити многих цианобактерий ветвятся и могут быть не только однорядными, но даже многорядными. Боковые выросты представляют собой ложное ветвление, так как образуются за счет вытеснения клеток из основной нити при делении. Некоторые нитевидные бактерии окружены общим слизистым чехлом – влагалищем (род *Sphaerotilus*).

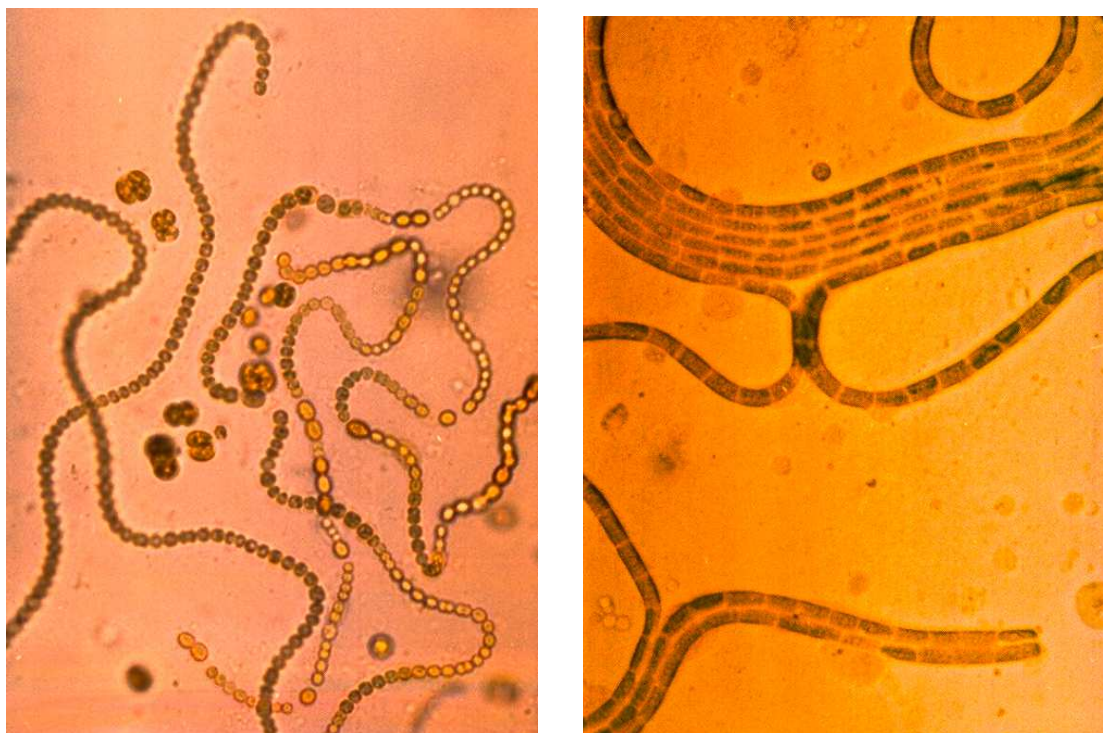


Рис. 8. Почвообитающие нитчатые цианобактерии.

Об. 20, ок. 10. Оригинал

Актиномицеты, или лучистые грибки (греческое «actis» - луч, «mycos» - гриб) отличаются от других микроорганизмов тем, что имеют длинный ветвящийся мицелий, напоминающий мицелий плесневых грибов, но в отличие от них очень тонкий, не имеющий перегородок. Актиномицеты – одноклеточные, прокариотические организмы, совмещающие в себе признаки бактерий и грибов. Иногда их называют грибобактериями.

С бактериями их сближает: одноклеточное строение; отсутствие ярко выраженного ядра (прокариоты); диаметр гиф мицелия (2 – 3 мкм).

С грибами их сближает: внешний вид (мицелиальное строение таллома); способ размножения (фрагментами гиф, спорами); длина гиф мицелия (до 200 мкм и более).

Низшие формы актиномицетов – проактиномицеты и коринеформные бактерии (род *Nocardia*, *Corynebacterium* и др.) – представляют собой одноклеточные формы, у которых наблюдается тенденция к образованию мицелия или ветвления. С возрастом клетки большинства видов распадаются на кокковидные или овальные формы. Практическое применение из этой группы микроорганизмов нашли многие виды рода *Corynebacterium*, являющиеся продуцентами аминокислот.

Истинные актиномицеты (эуактиномицеты) объединяются в несколько родов. Один из наиболее богатых видами – род *Streptomyces*. Эти микроорганизмы образуют сильно разветвленный мицелий, не имеющий поперечных перегородок.

Актиномицеты хорошо растут на питательных средах (крахмалоаммиачный, овсяной агар), образуя над поверхностью субстрата воздушный мицелий, а в толще питательной среды субстратный мицелий. На воздушном мицелии формируются специализированные гифы – спороносы, от которых отщипываются споры, служащие для распространения вида (рис. 9). Мицелий у истинных актиномицетов сохраняется в течение всего жизненного цикла, расчленения с возрастом на кокки и палочки не наблюдается.



Рис. 9. Морфология актиномицетов: 1 - мицелий; 2 - спороносы

Колонии актиномицетов мелкие, плотные, иногда имеют кожистую консистенцию. Многие стрептомицеты образуют пигменты, окрашивающие колонии в самые разные цвета (чаще всего колонии мелово-белые, темно-серые или бурые).

Значение актиномицетов в природе и жизни человека многообразно. Типичным местообитанием многих актиномицетов является почва. В ней они хорошо размножаются и успешно конкурируют с многочисленными почвообитающими микроорганизмами за пищевой субстрат благодаря наличию мощного ферментативного аппарата и способности продуцировать антибиотические вещества. Антибиотики актиномицетного происхождения широко используются в медицине (стрептомицин, тетрациклин), ветеринарии и животноводстве.

Методы приготовления микробиологических препаратов

Препараты живых клеток

Существует два основных метода приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов: «висячая капля» и «раздавленная капля».

Приготовление «висячей капли»

Небольшую каплю суспензии микроорганизмов наносят на покровное стекло и быстро поворачивают на 180°. Покровное стекло с висячей каплей опускают на специальное предметное стекло с лункой в центре с таким расчетом, чтобы капля свободно висела, не касаясь краев и дна лунки. В случае длительных наблюдений края луночки предварительно смазывают тонким слоем вазелина, и капля оказывается в герметически закрытой влажной камере.

Препарат просматривают в слегка затемненном поле (диафрагму сужают), что увеличивает контрастность неокрашенных форм.

Приготовление «раздавленной капли»

«Раздавленную каплю» готовят на обычном предметном стекле. Для этого на его поверхность наносят каплю жидкости (при работе с бактериями – водопроводную воду, при работе с микромицетами – смесь равных объемов этилового спирта и глицерина), вносят в нее небольшое количество исследуемых микроорганизмов, размещивают бактериологической петлей и накрывают покровным стеклом так, чтобы под ним не образовались пузырьки воздуха. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой, а материал, оставшийся на бактериальной петле, сразу же сжигают в пламени горелки. Культура микробов, выращенная в жидкой среде, помещается на предметное стекло стерильной пипеткой без предварительного нанесения капли жидкости. Пипетка после употребления сразу же опускается в стакан с дезинфицирующим раствором, сюда помещают и использованную фильтровальную бумагу.

Работая с культурами микроорганизмов, следует с первых же занятий научиться правильно держать пробирки, бактериологическую петлю, вынимать пробки из пробирок и закрывать ими пробирки (рис. 10).

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов

Приготовление мазка. Мазок готовят на чистом предметном стекле при помощи микробиологической петли из культур микробов, выращенных на плотной или жидкой питательных средах. Покровное стекло при этом не используется. Над пламенем горелки открывают пробирку, внутрь ее вводят петлю, охлаждают, после чего петлей соприкасаются с культурой, которую затем тонким слоем распределяют по поверхности предметного стекла на площади 2 – 3 см². При изготовлении мазков из плотных субстратов или агаровых культур на поверхность стекла сначала наносят каплю стерильного физиологического раствора или водопроводной воды.

Высушивание мазка. Нанесенный на предметное стекло мазок высушивают под контролем руки над пламенем горелки (стекло держат мазком вверх) или при комнатной температуре до полного высыхания. Правильно приготовленный мазок высыхает примерно за 30 секунд.

Фиксация мазка. Существует несколько методов фиксации мазка. Наиболее простой и распространенный среди них – фиксация на пламени горелки.

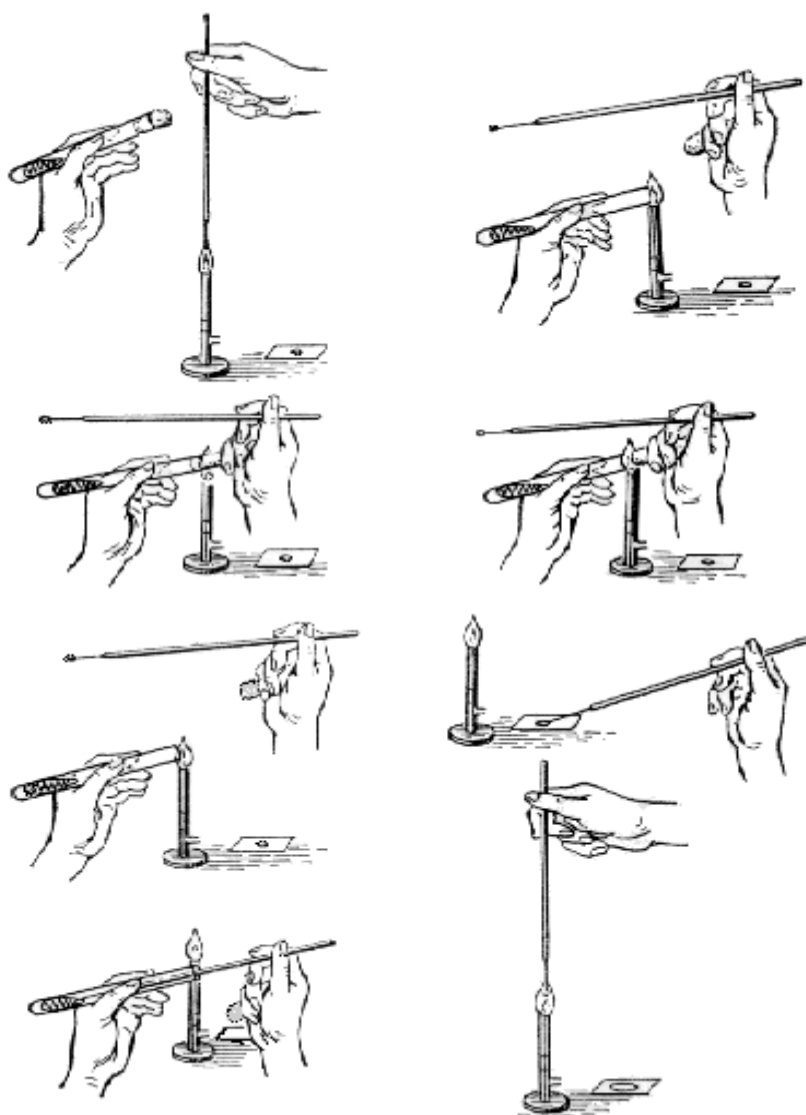


Рис. 10. Схема последовательности работ при изготовлении микробиологических препаратов

Для этой цели предметное стекло с мазком микробной культуры берут пинцетом и проводят 3 - 4 раза через фронт пламени горелки (*той стороной стекла, на которой клеток нет!*). В процессе фиксации микробы погибают, клетки прочно прикрепляются к стеклу, улучшается их окрашиваемость.

Мазки можно фиксировать этиловым спиртом (96%) в течение 10 – 15 мин, смесью этилового спирта и серного эфира (до испарения), ацетоном (в течение 5 мин), метиловым спиртом (2 – 3 мин). После окончания химической фиксации препарат следует осторожно промыть водой.

Окрашивание препарата. Фиксированные препараты можно микроскопировать только после окраски специальными красителями. Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители: основные, кислые и нейтральные.

Основные красители состоят из окрашивающего катиона и бесцветного аниона. Поскольку бактерии обладают поверхностным отрицательным зарядом и внутри клеток содержат нуклеиновые кислоты, то основные красители хорошо прокрашивают всю клетку, в частности ядерное вещество. Из основных красителей наибольшее применение получили основной фуксин, генциановый фиолетовый, метиленовая синь и др.

Группа кислых красителей плохо или совсем не окрашивает содержимое клеток и клеточную стенку бактерий, но хорошо красит фон, на котором клетки находятся. На этом основан *негативный* способ окраски препаратов. Из кислых красителей на практике часто используют конго красный, эозин, тушь.

При *простом* способе окраски на поверхность фиксированного мазка наносят несколько капель красителя. Препараты окрашивают при комнатной температуре в течение 2 – 3 минут. Затем краску смывают водой, а мазок высушивают с помощью фильтровальной бумаги, после чего наносят на него каплю иммерсионного масла.

При светопольной микроскопии фиксированные окрашенные препараты имеют ряд преимуществ перед прижизненными: высокую контрастность; возможность дифференцированного выявления клеточных структур; безопасность работы; длительность сохранения препарата.

Самостоятельная работа

1. Приготовление прижизненного препарата «раздавленная капля» из культуры почвенных микробов. Микроскопия и зарисовка схемы расположения жгутиков.

2. Приготовление фиксированного окрашенного мазка из смеси бактерий и бацилл. Окраска позитивным методом основным фуксином, микроскопия и зарисовка препарата.

3. Изучение демонстрационных препаратов (основные кокковые формы, извитые формы, актиномицеты).

4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Приготовление препарата «раздавленная капля».

Последовательность выполнения работы: 1) чистое предметное стекло захватывают пинцетом, прожигают в пламени горелки с целью обезжиривания и охлаждают на воздухе; строго соблюдая правила стерильности, отбирают из пробирки пипеткой взвесь бактерий и несколько капель (1-2) ее наносят на предметное стекло; 2) капли жидкости накрывают покровным стеклом, при этом покровное стекло сначала ставят на предметное стекло одним ребром (под острым углом к капле), а затем плавно опускают на каплю; микроскопию препарата выполняют со средним сухим объективом (40^X) или масляной иммерсией, диафрагму конденсора почти полностью закрывают; 3) на полутемном поле зрения микроскопа наблюдают движущиеся контуры клеток, фиксируя различный характер и скорость движения.

Работа 2. Приготовление фиксированного окрашенного мазка из баксмеси.

Мазок следует готовить тонким, стараясь не наносить на стекло много материала. Хорошо приготовленный мазок должен после сушки выглядеть на предметном стекле как едва заметный налет. Во время сушки и фиксации мазка нельзя перекаливать стекло, так как клетки микроорганизмов могут деформироваться и даже обуглиться. После фиксации следует, выждав несколько секунд, приложить стекло к коже руки. Ощущение легкого жжения свидетельствует о том, что мазок не перефиксирован.

Фиксированный препарат помещают на стеклянный мостик (из параллельных стеклянных палочек, соединенных резиновыми трубочками), лежащий на стенках кюветы, и наносят из капельницы раствор красителя таким образом, чтобы красителем был покрыт весь мазок. Выдерживают не менее 1 мин, а затем промывают водой из колбы-промывалки и высушивают, промокая фильтровальной бумагой.

При микроскопии окрашенного препарата конденсор должен быть поднят вверх, а диафрагма конденсора открыта. Под микроскопом отмечают равномерное окрашивание клеток бактерий и наличие спор в виде неокрашенных участков (гранул) в клетках бацилл.

Работа 3. Просмотр и зарисовка демонстрационных препаратов.

Изучают шаровидные формы бактерий – диплококки, стрептококки, сарцины и стафилококки. Обращают внимание на группировку клеток. С извитыми формами знакомятся на постоянных препаратах из зубного налета. Выполняют микроскопию препарата из культуры актиномицета.

По окончании работы демонстрационные препараты должны быть сданы преподавателю или лаборанту кафедры (!).

В протоколе занятий необходимо: записать методику приготовления препарата «раздавленная капля», зарисовать схему расположения жгутиков у бактерий; записать методику приготовления мазка; выполнить рисунки палочковидных, кокковидных, извитых форм бактерий; записать отличительные признаки актиномицетов, зарисовать внешний вид мицелия и спораносцев актиномицетов.

Контрольные вопросы

1. Опишите морфологию бактериальной клетки (форму, споры, жгутики).
2. В чем заключаются особенности строения актиномицетов?
3. Какую функцию выполняют споры у бацилл и кластридий?
4. Какие методы (препараты) используют для определения способности бактерий передвигаться?
5. Какие существуют способы фиксации бактериальных препаратов? С какой целью выполняется фиксация мазка?
6. Опишите технику приготовления мазка из культуры бактерий.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 19 – 28, 30 - 32.
2. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 15 – 22.

Занятие 3. Морфология цианобактерий, микроводорослей и простейших

Цель занятия. Ознакомление с морфологией цианобактерий, микроскопических водорослей и простейших одноклеточных животных (Protozoa).

План занятия. 1. Изучение морфологии одноклеточных и многоклеточных цианобактерий.

2. Изучение морфологии отдельных представителей микроводорослей.

3. Ознакомление с морфологией простейших.

4. Самостоятельная работа: приготовление препарата «раздавленная капля» из культуры *Nostoc* и *Phormidium*; приготовление препаратов «висячая капля» из «цветущей» воды аквариума и «раздавленная капля» из культуры *Chlorella vulgaris*; исследование постоянного препарата почвенных диатомовых водорослей; обнаружение на препарате из активного ила представителей простейших – амёб, инфузорий, сувоек; зарисовка микроскопической картины всех исследуемых препаратов.

Оборудование и материалы. Микроскопы. Чашки сливные, мостики. Спиртовки. Бактериологические петли. Препаровальные иглы. Предметные стекла обычные и с луночкой. Покровные стекла. Пипетки. Демонстрационные препараты диатомовых водорослей. Культуры цианобактерий и хлореллы. Образцы активного ила и «цветущей» воды в стаканах или колбах. Таблицы: цианобактерии; водоросли (зеленые, желто-зеленые, диатомовые); протозоа активного ила и почв.

Пояснения к занятию

По строению клетки цианобактерии – типичные прокариотические организмы, лишенные ядра и характерных клеточных органелл, за исключением рибосом. Клеточная оболочка цианобактерий соответствует оболочке грамотрицательных бактерий. Протопласт дифференцирован на периферическую окрашенную хроматоплазму и центральную бесцветную центроплазму. В хроматоплазме присутствуют изолированные пигментонесущие тилакоиды. В центроплазме находится генетический аппарат клетки в виде одной гигантской хромосомы (нуклеоид). Цианобактерии размножаются бесполым путем в результате множественного деления и гормогониями. Типичного полового процесса нет. Отсутствует также жгутиковый аппарат.

Раньше цианобактерии называли синезелеными водорослями, так как подобно растениям и водорослям они осуществляют фотосинтез с выделением кислорода, т.е. относятся к аэробным оксигенным фотолитотрофам.

Для эколога цианобактерии представляют значительный интерес как в теоретическом, так и практическом аспектах. Эта группа микроорганизмов широко распространена в водоемах (вызывают при массовом развитии «цветение» воды), почвах, грунтах, бедных питательными веществами (пески пустынь, скалы), отдельные виды входят в состав лишайников. Способны фиксировать молекулярный азот атмосферы, переносить экстремальные усло-

вия окружающей среды, принимают участие в первичном почвообразовательном процессе.

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа и включает как одноклеточные, так и многоклеточные формы. Одноклеточные формы представлены палочками и кокками, которые часто существуют в виде колоний, объединенных капсулами и слизью. Многоклеточные формы – это нитчатые бактерии. У некоторых нитчатых цианобактерий, фиксирующих молекулярный азот, наблюдается дифференциация клеток. Они образуют гетероцисты, которые являются местом фиксации молекулярного азота, а также покоящиеся клетки с утолщенной оболочкой – акинеты. Последние часто можно увидеть в составе тела цианобактерий рода Анабена (*Anabaena*), они крупнее вегетативных клеток и гетероцист, интенсивно окрашены и буквально набиты цианофициновыми зёрнами, отчего их содержимое принимает зернистую структуру.

Среди многочисленной и разнообразной группы эукариотических водорослей объектами исследования микробиологов являются преимущественно одноклеточные формы – представители зеленых (*Chlorophyta*), желто-зеленых (*Xanthophyta*) и диатомовых (*Bacillariophyta*) водорослей. Эти формы составляют основную массу планктона, принимают участие в процессах самоочищения природных водоемов, очистки сточных вод в очистных сооружениях (поля фильтрации), обогащают воду кислородом, могут вызывать «цветение» воды. Значительное количество водорослей обитает в почве, образуя флористически и экологически обособленные группировки – почвенные альгоценозы. Водоросли играют важную роль в почвообразовании, отмершие водорослевые клетки служат источником энергии для бактерий и грибов. Некоторые микроводоросли культивируют с целью получения биологически активных веществ и биомассы, богатой белком (хлорелла, спирулина и др.). Водоросли используются как тест-объекты в целях биоиндикации состояния окружающей среды.

Клетки водорослей, как правило, состоят из оболочки (в состав оболочки входит преимущественно целлюлоза), цитоплазмы, оформленного ядра с ядерной мембраной, вакуоли и хроматофора, имеющего разнообразную форму.

Зеленые водоросли имеют чисто зеленую окраску, каротиноиды и ксантофиллы имеются в клетках, но не маскируют хлорофилл. Хроматофор с пиреноидами. Размножение осуществляется вегетативным, бесполом и половым путем. Вегетативное размножение происходит путем деления организма на части. Бесполое размножение осуществляется подвижными зооспорами со жгутиками равной величины или апланоспорами – неподвижными спорами. Представителями зеленых водорослей являются хламидомонада, эвглена, хлорелла и др. (рис. 11).

Эвглена (*Euglena gracillius*) – типичный представитель подвижных форм. Клетки зеленые, часто веретеновидные, имеющие близ переднего конца красный глазок. Это фоторецептор, определяющий движение клетки к свету. Передний конец клетки косо закруглен, здесь крепятся два жгутика. Задний конец клетки вытянут и сужен. Однако форма клетки может быть изменчивой, так как вместо жесткой клеточной стенки эвглена имеет эластичную пленку - пелликулу. Размножение осуществляется путем продольного деления.

Эвглены участвуют в самоочищении вод, служат пищей для простейших животных и личинок насекомых. Некоторые эвглены являются показателем загрязнения воды органическими веществами.

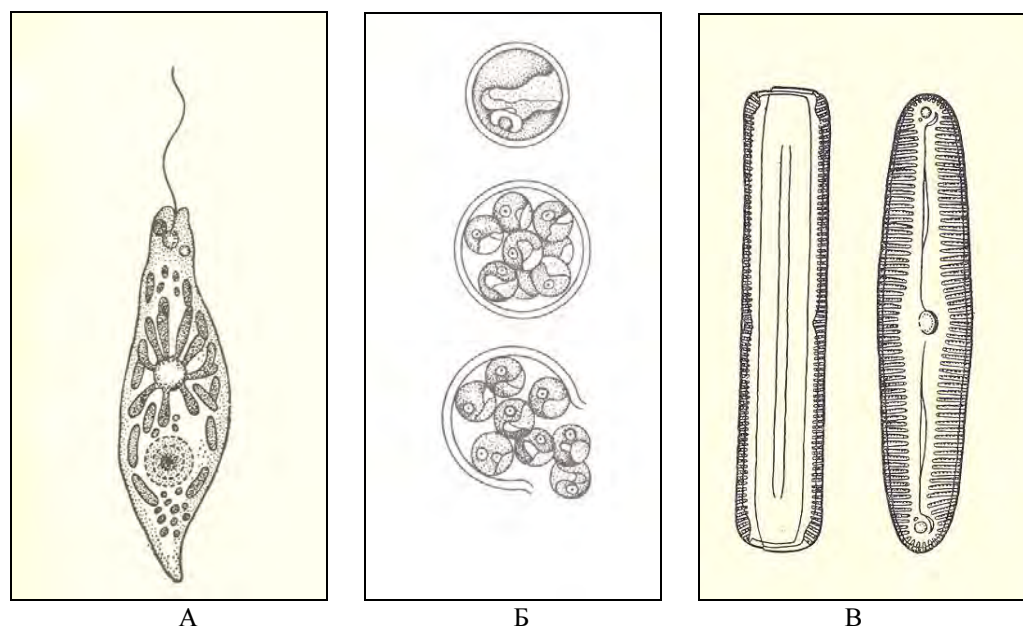


Рис. 11. Водоросли: А – эвглена; Б – хлорелла (общий вид клетки, образование автоспор и их выход из материнской клетки); В – пиннулярия (вид панциря с пояска и со створки)

Хлорелла (*Chlorella vulgaris*) – очень широко распространенная водоросль. В природе она встречается в планктоне и бентосе водоемов, на почве, участвует в образовании тела лишайников, а также живет в симбиозе с мелкими животными, образуя зоохлореллы. Это одна из культивируемых водорослей.

Хлорелла – одноклеточная коккоидная водоросль шаровидной формы. В протопласте находится колоколообразный, с большим углублением, хроматофор, в его впадине можно обнаружить ядро. Размножается хлорелла только бесполом путем – автоспорами – маленькими клеточками, образующимися по 4 – 8 в материнской клетке и выходящими наружу через разрыв оболочки; половой процесс неизвестен.

Диатомовые водоросли – одноклеточные и колониальные организмы с кремневым панцирем, состоящим из двух половинок, называемых створками. Хроматофор желтого или светло-бурого цвета от наличия в нем, кроме хлорофилла, бурого пигмента диатомина. Размножение осуществляется путем деления клеток на две, у некоторых диатомовых наблюдается образование двужгутиковых зооспор. Известен половой процесс. К диатомовым водорослям относятся пиннулярия, навикула, синедра и др. (рис. 11).

Пиннулярия (*Pinnularia intermedia*) – обитает в иле озер, рек, болот, почве. Имеет большое значение как кормовая база мелких животных и служит начальным звеном пищевых цепей в водных экосистемах.

Пиннулярия обладает шовно-узелковым аппаратом и вследствие этого способна активно передвигаться, ползая по субстрату. Со стороны пояска панцирь имеет прямоугольную форму, а со стороны створки удлиненно-овальную. Концы створок чаще закругленные. По краям створки хорошо заметен четкий рисунок из параллельных ребер, не достигающих шва. Клетки пиннулярии одноклеточные с двумя пластинчатыми хроматофорами. Живые активные клетки пиннулярии окрашены в желтовато-бурый цвет. В клетках имеются две вакуоли, разделенные центральным цитоплазматическим мостиком, в котором заключено ядро. Размножается пиннулярия делением, проходящим параллельно створкам. Каждая дочерняя створка получает одну материнскую створку, а вторую достраивает сама. Вследствие такой особенности при каждом делении одна дочерняя клетка всегда несколько мельче материнской. Половой процесс у пиннулярии не обнаружен.

Наряду с цианобактериями и водорослями в наземных экосистемах широко распространены микроскопические одноклеточные животные – *простейшие (Protozoa)*. После бактерий, актиномицетов и грибов простейшие составляют наиболее многочисленную группу почвенного микронаселения, а также являются обычными обитателями водоемов (зоопланктон) и активных илов. Питаются бактериями и взвешенными органическими частичками, простейшие способствуют осветлению воды. Многие из них используются в гидробиологических и экологических исследованиях как индикаторы состояния водоемов. По развитию тех или иных форм простейших (амебы, сувойки и др.) судят о качестве очистки сточных вод.

Клетки простейших эукариотические, дифференцированные на переднюю и заднюю части, имеют ротовое отверстие, одно или два ядра. Размножаются простейшие бесполым (деление клетки) или половым путем (конъюгация).

Классификация простейших основана на способах движения: в класс *саркодовые* объединены виды, органы движения которых представлены изменчивыми протоплазматическими отростками – псевдоподиями (амебовидные – Rhizopoda); у *жгутиковых (Mastigophora)* подвижность обусловлена одним или несколькими жгутиками; движение *инфузорий* (ресничные – Ciliata) осуществляется за счет координированной системы ресничек; неподвижные формы простейших объединены в класс *споровиков (Sporozoa)*.

Представители саркодовых (корненожки) отличаются незначительной дифференциацией клетки (рис. 12). Тело не имеет раковины или панциря. Цитоплазма более или менее дифференцирована на экто- и эндоплазму. Эктоплазма гиалиновая, гомогенная и представляется более вязкой, чем эндоплазма. Последняя гранулирована или вакуолизирована и содержит ядро (ядра), пищевые и сократительные вакуоли, кристаллы и другие включения. Псевдоподии – временные цитоплазматические выросты – имеют форму широких либо узких лопастей. Псевдоподии служат как для движения, так и захвата пищи. Бесполое размножение происходит обычно путем деления на две особи. Часто имеет место образование цист.

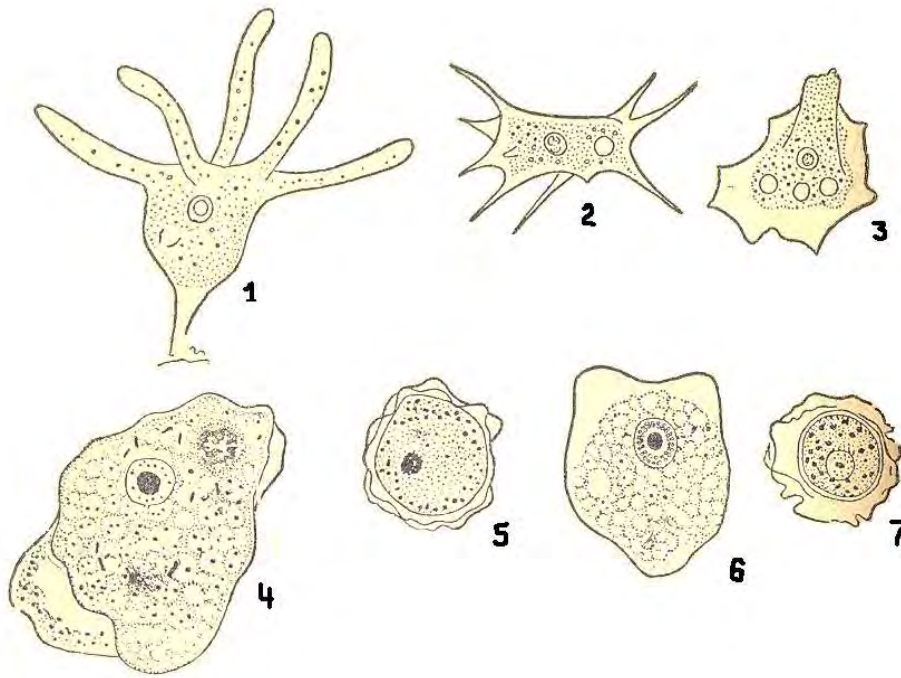


Рис. 12. Почвенные Rhizopoda: 1 – *Amoeba gorgonia*; 2-3 – *Amoeba vespertilio*; 4-5 – *Acanthamoeba castellanii*; 6-7 – *Acanthamoeba hyalfina*

Инфузории (ресничные) – одна из наиболее многочисленных и разнообразных групп простейших. Для этой группы характерен высокий уровень дифференциации тела. Многие представители имеют форму эллипса, поверхность которого покрыта тонкими ресничками. Типичным представителем этой группы является инфузория-туфелька (*Paramecium caudatum*). Форма других пред-

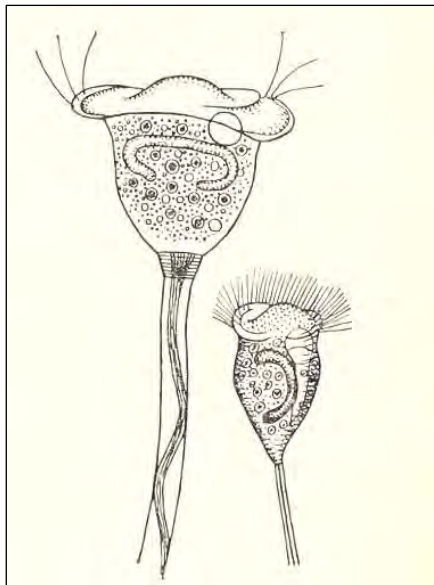


Рис. 13. Сувойки

ставителей этого класса напоминает бутоны растений (рис. 13). Реснички спиралеобразно окружают ротовое отверстие, клетки имеют стебельки, с помощью которых они могут прикрепляться к субстрату.

По поведению кругоресничных инфузорий – *сувоек* – экологи судят о состоянии водоемов: при нехватке кислорода или поступлении в воду токсикантов ножка сжимается, а колокольчик превращается в шарик, внутрь которого спрятаны все реснички.

Очень интересным объектом для наблюдений является инфузория *лакримария*, которую иногда называют лебедем микромира (рис. 14). Она действительно напоминает птицу: отросток передней части у *лакримарии* похож на лебединую шею. Сходство еще более усиливается, когда

во время плавания или погони за пищей гибкий отросток передней части инфузории грациозно изгибается.

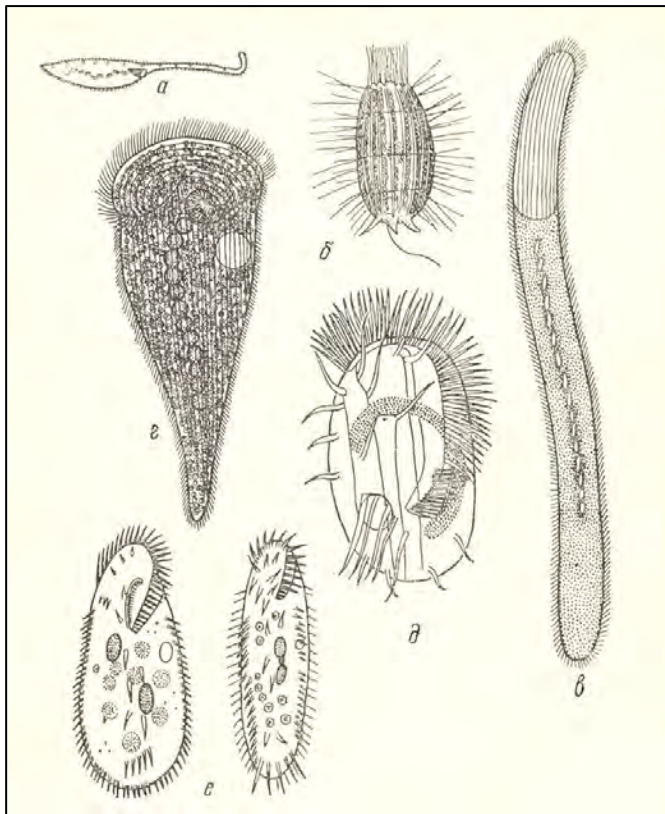


Рис. 14. Инфузории: а – лакримария; б – коллепс; в – спиростом; г – стентор; д – эуплотес; е – окситриха и стилонихия

Среди равноресничных инфузорий особо выделяется *коллепс*. Тело его напоминает по виду бочонок с бороздками, и движется он, перекатываясь с боку на бок. Коллепс незаменим в водоеме как чистильщик. Там, где есть коллепсы, вода всегда будет чистой.

Инфузория *спиростом* из класса разноресничных достигает длины 2 мм и видна невооруженным глазом. Спиростом обладает развитым свойством регенерации – даже из 1/60 части инфузории регенерируется целая особь.

В капле воды, взятой из пруда, можно обнаружить инфузорию-трубача (*стентор*). Размножается он, как и большинство инфузорий, делением, но так быстро, что иногда вновь появившиеся особи не успевают отделиться друг от друга. Эту инфузорию благодаря оригинальной форме невозможно спутать с другими микроорганизмами.

В воде можно наблюдать брюхоресничных инфузорий – *стилонихию*, *эуплотес*, *окситриху*. Протозоа этого класса плоские и бегают на ресничках, покрывающих их брюшную часть. Появление большого количества брюхоресничных инфузорий указывает на то, что вода в водоеме достаточно чистая.

Эту инфузорию благодаря оригинальной форме невозможно спутать с другими микроорганизмами.

Самостоятельная работа

1. Приготовление прижизненного препарата «раздавленная капля» из культуры *Nostoc* и *Phormidium* с последующей зарисовкой (об. 40^{\times}).
2. Приготовление препаратов «висячая капля» из «цветущей» воды аквариума и «раздавленная капля» из культуры *Chlorella vulgaris*. Микроскопия и зарисовка выявленных форм водорослей (об. 40^{\times}).
3. Изучение постоянных препаратов диатомовых водорослей (об. 40^{\times}).
4. Микроскопическое исследование протозоа активного ила (об. 20^{\times} и 40^{\times}). Зарисовка выявленных форм простейших.
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

При подготовке препарата «раздавленная капля» из культуры цианобактерий материал с поверхности питательной среды лучше всего отбирать с помощью препаровальных игл. Помещенные в каплю воды нити следует тщательно разделить.

Зеленый налет со стенок аквариума и клетки хлореллы отбирают бактериологической петлей. Следует рассмотреть объекты сначала при малом увеличении, затем при большем, используя сухие объективы. Выявить подвижные формы водорослей.

На постоянном препарате диатомовых водорослей выявить клетки пиннулярии и навикулы.

При ознакомлении с морфологией простейших следует приготовить препарат «висячая капля» из активного ила очистных сооружений. Для приготовления препарата осадок отбирают пипеткой. Следует обнаружить различных представителей простейших: амёб, инфузорий.

В протоколе исследований необходимо зарисовать участок таллома цианобактерии *Nostoc*, показать на рисунке гетероцисты. Выполнить серию схематических рисунков, на которых отразить строение эвглены, хлореллы (и цикл ее развития), пиннулярии. Сделать схематические рисунки амёб, сувоек, инфузорий различных классов. Обязательно указать названия зарисованных объектов. Кратко описать значение цианобактерий, водорослей и простейших в природе.

Контрольные вопросы

1. Опишите строение нитчатых цианобактерий и особенности их размножения.
2. Какую функцию выполняют гетероцисты и акинеты?
3. Какова роль цианобактерий в природе, в частности в почве?
4. Опишите характерные особенности водорослей.
5. Каково значение водорослей в природе и жизни человека?
6. Какие классы простейших Вы знаете, чем они отличаются?

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 29 – 30, 39 – 43.
2. Практикум по систематике растений и грибов / Под ред. А.Г. Еленевского. – М.: Издательский центр «Академия», 2001. – С. 4 – 12, 26 – 29.

Занятие 4. Морфология микромицетов и дрожжей.

Классификация грибов

Цель занятия. Ознакомиться с морфологией важнейших микроскопических грибов - представителей царства *Mycota* (*Fungi*), их классификацией.

План занятия. 1. Изучение общей характеристики и классификации грибов.

2. Изучение морфологии грибов сем. Мукоровые (*Mucoraceae*).

3. Изучение морфологии культурных (пекарских) дрожжей рода Сахаромицеты (*Saccharomycetes*).

4. Изучение морфологии грибов порядка Гифомицеты (*Hyphomycetales*).

5. Самостоятельная работа: изучение культуральных и морфологических свойств некоторых видов микромицетов и дрожжей.

Оборудование и материалы: чашки с двухсуточной культурой мукора и трехсуточными культурами аспергилла и пеницилла. Чашки с чистой культурой пекарских дрожжей на агаризованной питательной среде. Микробиологи-

ческие петли и препаровальные иглы. Предметные и покровные стекла. Пинцеты. Спиртовки. Микроскопы. Иммерсионное масло. Раствор Люголя в капле-ницах. Таблицы: классификация грибов, схемы строения мукора, аспергилла, пеницилла, дрожжей.

Пояснения к занятию

Общая характеристика грибов

Объектами исследования микробиологов и экологов служат многие виды микроскопических грибов (микромикетов). Грибы – это бесхлорофильные, гетеротрофные, эукариотические организмы, составляющие отдельное царство природы – Мусота. Вегетативное тело грибов (таллом) представлено мицелием (грибницей), образованным тонкими гифами (нитеями, трубочками). Некоторые грибы мицелия не имеют и существуют в одноклеточной форме (например, дрожжи). Структурным компонентом клеточной стенки грибов является хитин. Они отличаются апикальным (верхушечным) ростом, неподвижны (только споры отдельных грибов обладают жгутиками и могут двигаться в водной среде). Размножаются грибы спорами, которые имеют половое и бесполое происхождение, а также вегетативно – почкованием, фрагментами мицелия и его видоизменениями (ризоморфами, склероциями, хламидоспорами, оидиями, геммами).

Плесневые грибы не требовательны к питательным средам, но большинство из них нуждается в кислороде воздуха (аэробы), обладают мощным гидролитическим ферментативным аппаратом и способны существовать на различных субстратах. Типичной средой обитания многих грибов является почва. Споры грибов можно обнаружить в любых экосистемах: в водной, воздушной среде, на поверхности растений, продуктов питания и т.д. Среди грибов встречаются как сапротрофы, так и паразиты, вызывающие заболевания растений, животных и человека (микозы). Грибы принимают активное участие в круговороте углерода в биосфере, некоторые из них формируют микоризу, являются активными продуцентами биологически активных веществ - антибиотиков (пенициллин, трихотецин), ферментов (гидролазы), кормового белка, аминокислот (лизин), токсинов (афлатоксины, фузариотоксины и др.), органических кислот (лимонная, щавелевая). Отдельные микромикеты и их ассоциации используются экологами для биоиндикации состояния окружающей среды.

Классификация грибов и морфология конкретных представителей

Грибы подразделяют на высшие и низшие. Группа низших грибов характеризуется тем, что представители имеют одноклеточный, несептированный мицелий (гифы без перегородок, септ). Высшие грибы имеют септированный мицелий (гифы с перегородками, многоклеточные). Группу низших грибов составляют классы: хитридиомикеты (*Chytridiomycetes*), оомицеты (*Oomycetes*) и зигомицеты (*Zygomycetes*); группу высших грибов – аскомицеты (*Ascomycetes*), базидиомикеты (*Basidiomycetes*), дейтеромицеты, или несовершенные грибы (*Deuteromycetes*).

Представители класса *зигомицетов* (низшие грибы) традиционно являются объектами исследования микробиологов. Вегетативное тело зигомицетов представлено хорошо развитым ценоцитным мицелием без перегородок. В зрелом мицелии иногда появляются перегородки. Бесполое размножение осуществляется с помощью спорангиоспор (эндогенных неподвижных спор, образующихся в спорангиях) или конидий. Спорангиоспоры характерны для мукоральных, а конидии для энтомофторальных грибов. Спорангии зигомицетов преимущественно имеют шаровидную или грушевидную форму. Они отделены от несущей гифы (спорангиеносца) перегородкой. У многих видов перегородка в виде арки вдается в полость спорангия и образует так называемую колонку (рис. 15).

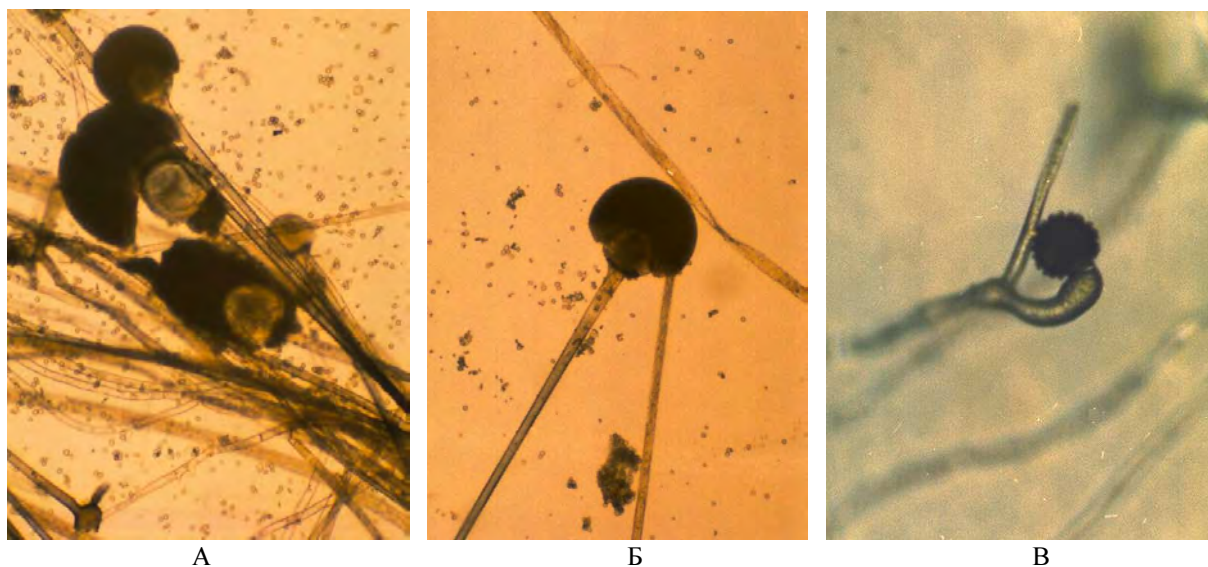


Рис. 15. *Rhizopus nigricans*: А – группа спорангиеносцев со спорангиями; Б – отдельный спорангий; В – формирующаяся зигоспора.

Об. 40, ок. 10. Оригинал

Спорангиоспоры прорастают ростковой гифой, которая развивается в новый мицелий. Половой процесс – зигогамия, при котором происходит слияние содержимого двух многоядерных клеток (гаметангиев). Копулирующие отростки зигомицетов обычно имеют вид коротких боковых ответвлений вегетативных гиф. Морфологически они идентичны вегетативным гифам либо отличаются от них колбовидной или грушевидной формой. При слиянии копулирующих отростков от них отделяются перегородкой многоядерные клетки – голоциты; их содержимое сливается и образуется зигоспора, покрытая утолщенной скульптурированной темно-коричневой оболочкой. Зигоспоры прорастают ростковой трубкой, на которой формируется спорангий.

Порядок Мукоровые (*Mucorales*) самый большой по числу видов среди зигомицетов. Сюда входят род Мукор (*Mucor*) и род Ризопус (*Rhizopus*). Многочисленные виды этих родов обитают преимущественно в почве, на различных органических остатках, а также на поверхности растений.

Класс сумчатых грибов (*аскомицеты*) один из наиболее крупных среди высших грибов, насчитывающий более 30 тыс. видов. Грибы этого класса представлены видами, имеющими многоклеточный ветвящийся мицелий. У аскомицетов различают два способа размножения: половой и бесполой. Бесполое размножение осуществляется экзогенными спорами – конидиями, развивающимися на конидиеносцах. При половом способе размножения слияние двух ядер приводит к образованию сумки (аска), внутри которой в результате деления диплоидного ядра образуются гаплоидные аскоспоры. Сумки формируются либо прямо на мицелии, либо в плодовых телах – клейстотециях (замкнутые), перитециях (полузамкнутые), апотециях (открытые, чашевидные), либо в аскостромах.

Особую группу среди аскомицетов составляют дрожжи. Это одноклеточные организмы. Клетки дрожжей могут быть округлой, овальной, грушевидной, игловидной, лимоновидной формы. Клетки дрожжей крупные, в диаметре достигают 10 – 15 мкм и более.

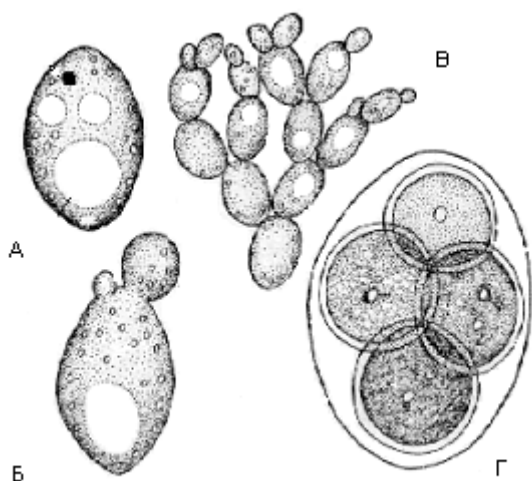


Рис. 16. Культурные дрожжи: А – клетка дрожжей; Б – начало почкования; В – интенсивное почкование; Г – сумка с аскоспорами

Дрожжевая клетка имеет развитую клеточную стенку, цитоплазму с многочисленными включениями запасного вещества – гликогена, оформленное (с мембраной) ядро.

Размножаются дрожжи преимущественно вегетативно – почкованием, когда на материнской клетке возникает выпуклость – почка, которая постепенно увеличивается в размерах и отделяется. Почкованию способствует достаточное количество сахара, оптимальная температура (25 – 30⁰С), аэрация. При недостатке питания у дрожжей можно наблюдать половой процесс. Он

заключается в копуляции двух гаплоидных клеток. Из зиготы образуется сумка с 4 – 8 аскоспорами, перед образованием аскоспор происходит редукционное деление ядра (рис. 16).

Большое практическое значение имеют пивные (хлебные) и винные дрожжи из рода *Saccharomyces*. Они используются в пивоварении, хлебопечении, виноделии, медицине, сельском хозяйстве. Клетки дрожжей богаты белком и витаминами.

Класс базидиальных грибов (*базидиомицеты*) отличается тем, что бесполое размножение (конидиями) у них встречается крайне редко. Базидиомицеты размножаются преимущественно половым путем. Характерный признак класса – наличие базидий, на которых экзогенно образуются базидиоспоры. Базидии с

базидиоспорами могут возникать прямо на мицелии, телеитоспорах или хламидоспорах, но у большинства образуются на плодовых телах или внутри них. У высших базидиомицетов плодовые тела имеют сложное строение, они дифференцированы на разные по форме стерильную и плодоносную части, более или менее приподнятые над субстратом и имеют шляпку и ножку.

Мицелий базидиомицетов многоклеточный, многоядерный, его отличительным признаком является наличие пряжек – особых мицелиальных отростков крючкообразной формы, располагающихся над клеточными перегородками.

Для эколога базидиомицеты представляют определенный интерес: среди представителей этого класса встречается значительное число видов микоризообразующих грибов, возбудители опасных болезней растений (головневые и ржавчинные грибы), отдельные базидиомицеты способны аккумулировать в мицелии тяжелые металлы и используются для биоиндикации состояния окружающей среды.

Класс несовершенных грибов (*дейтеромицеты*) – большая группа грибов, включающая как многоклеточные мицелиальные формы, так и одноклеточные (дрожжи). Важнейшим отличительным признаком грибов этого класса является полная утрата в процессе эволюции стадии полового спороношения. Размножение осуществляется бесполоыми спорами экзогенного происхождения – конидиями. Некоторые виды имеют сумчатую стадию, но она образуется очень редко, и ее роль в распространении и сохранении вида становится все более незначительной.

В настоящее время этот класс рассматривается как новая, находящаяся в процессе становления эволюционная ветвь грибов полифилетического происхождения, развитие которой идет в направлении совершенствования конидиального аппарата. Представители класса *Deuteromycetes* часто являются конидиальными стадиями (анаморфами) совершенных грибов (аскомицетов и базидиомицетов), утратившими с ними связь и перешедшими к самостоятельному существованию.

К несовершенным грибам относятся широко распространенные в природных и техногенных экосистемах грибы таких родов, как *Penicillium*, *Aspergillus* (иногда образуют сумчатую стадию спороношения, поэтому некоторые исследователи относят их к аскомицетам), *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Oidium* и многих других, а также дрожжи рода *Candida* и *Rhodotorula*.

Виды пенициллов и аспергиллов являются типичными почвообитающими грибами, некоторые из них продуцируют антибиотики (пенициллин), органические кислоты, микотоксины. Эти грибы имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий. Размножаются преимущественно конидиальным спороношением.

Грибы рода *Penicillium* (рис. 17) называют кистевиками, что связано со сходством мутовчато разветвленных конидиеносцев с кистью человеческой руки. Иногда конидиеносцы напоминают рисовальные кисти или метелки.

Грибы рода *Aspergillus* отличаются тем, что их одноклеточные конидиеносцы имеют на вершине шаровидное, булавовидное или грушевидное вздутие. На таком расширении располагаются параллельно друг другу короткие

кеглеобразные стеригмы, каждая из которых отшнуровывает радиально цепочки конидий. Вся головка конидиеносца, покрытая стеригмами, напоминает цветок подсолнечника (рис. 17).

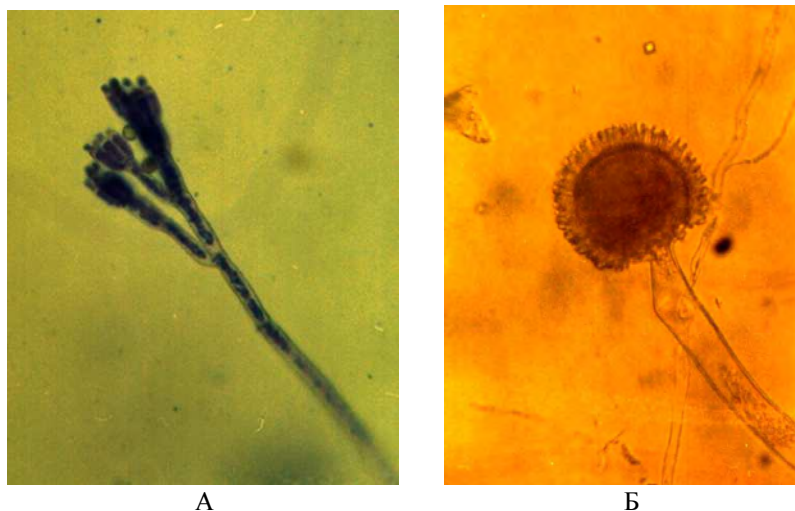


Рис. 17. Строение конидиального аппарата пеницилла и аспергилла:
А – кистевидный конидиеносец пеницилла (на снимке хорошо видны веточки, мутовки фиалид). Об. 20, ок. 10. Оригинал;
Б – конидиеносец аспергилла с характерным шаровидным расширением, покрытым слоем конидиогенных клеток (стеригм). Об. 40, ок. 10. Оригинал

Самостоятельная работа

1. Изучение культуральных свойств грибов *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, выращенных на чашках Петри при малом увеличении.
2. Приготовление препаратов «раздавленная капля» из культур микроскопических мицелиальных грибов. Микроскопия и зарисовка морфологии грибов.
3. Приготовление «раздавленной капли» с постановкой гранулезной реакции из культуры пекарских дрожжей с последующей микроскопией, зарисовкой строения дрожжевой клетки и способов размножения.
4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Изучение культуральных свойств грибов.

Культуральные свойства мицелиальных грибов изучают невооруженным глазом (визуально), а затем при слабом увеличении микроскопа (об. 8^X) непосредственно на чашках Петри. Следует обратить внимание на характер воздушного мицелия (пушистый, бархатистый и другой, окраска, высота) и описать его в альбоме.

Чашки с посевами грибов следует открывать **осторожно**. Необходимо помнить, что плесневые грибы размножаются чрезвычайно подвижными в воздушной среде спорами, которые легко могут попасть в дыхательные пути и вызвать у человека аллергические реакции.

Работа 2. Изучение морфологии мицелиальных грибов.

Из культуры гриба, выращенного на плотной среде (сусло-агар или агар Чапека), готовят препарат «раздавленная капля». В центр предметного стекла наносят каплю воды (лучше применять смесь спирта с глицерином). Препаровальными иглами вырезают небольшие участки мицелия из периферийной части колоний грибов (агар стараются не захватывать) и тщательно распределяют на предметном стекле в капле жидкости, а затем накрывают покровным стеклом. В культуре ризопуса и аспергилла лучше брать молодые серые головки, пеницилла – на грани белой и зеленой зоны колонии.

Готовить препарат надо вблизи пламени, не допуская рассеивания спор. Препаровальные иглы по окончании работы прокалить.

При микроскопии (объективы 8^{\times} и 40^{\times}) следует отметить строение мицелия (одноклеточные или многоклеточные гифы), органов размножения - спорангиеносцев со спорангиями или конидиеносцев; зарисовать характерные особенности рассмотренных грибов.

Работа 3. Изучение строения культурных (пекарских) дрожжей на препарате «раздавленная капля» с постановкой гранулезной реакции.

Препарат с постановкой гранулезной реакции готовится аналогично «раздавленной капле», отличается тем, что добавляют небольшую каплю раствора Люголя под покровное стекло. При этом крахмалоподобное вещество дрожжевой клетки окрашивается в золотисто-коричневый цвет. На препарате следует выявить почкующиеся клетки, зарисовать их.

В протоколе исследования необходимо зарисовать схемы строения грибов в крупном масштабе. Сделать надписи к рисункам. Записать в альбом общую характеристику царства грибов и их классификацию.

Контрольные вопросы

1. Дайте общую характеристику грибов.
2. Каковы особенности строения мицелия микроскопических грибов?
3. Как размножаются микромицеты? Что такое «конидии»?
4. Назовите главную отличительную особенность грибов класса дейтеромицеты, укажите конкретных представителей этого класса.
5. Что такое дрожжи? Дайте им характеристику.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 33 – 39.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 23 – 28.

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология микроорганизмов изучает процессы жизнедеятельности микроскопических существ, их физиологические свойства, т.е. потребность в питательных веществах (тип питания), способы биологического окисления (тип дыхания), реакции клетки на воздействие различных факторов среды обитания. Иметь представление о физиологических особенностях микроорганизмов важно для понимания их расселения и поведения в природе, а также для использо-

вания в хозяйственной деятельности человека. В лабораторной практике исследование физиологических свойств микроорганизмов проводится наряду с морфологическими для их идентификации.

На занятиях по данной теме студенты знакомятся с принципами культивирования микроорганизмов, традиционными методами определения численности микробов в объектах окружающей среды (почва, вода, воздух) путем посева на питательные среды и выделения чистой культуры (одного вида) из смеси микроорганизмов.

Занятие 5. Методы культивирования микроорганизмов. Микробиологическая аппаратура

Цель занятия. Ознакомиться с условиями культивирования микробов, приготовлением простых питательных сред (МПА и МПБ), методами стерилизации, микробиологической техникой и аппаратурой.

План занятия. 1. Ознакомление со свойствами и классификацией питательных сред, условиями культивирования микробов.

2. Ознакомление с методами стерилизации.

3. Изучение микробиологической аппаратуры.

4. Самостоятельная работа: просмотр коллекции демонстрационных питательных сред; приготовление 100 мл МПБ и МПА, определение рН питательной среды колориметрическим методом; изучение устройства и действия аппаратуры для стерилизации (автоклав, сушильного шкафа, фильтра Зейтца, бактерицидных ламп) и культивирования микробов (термостат).

Оборудование и материалы: коллекция питательных сред; колбы Эрленмейера с мясной водой и МПБ. Мерные стаканчики. Фильтры из фильтровальной бумаги. Марлевые фильтры. Воронки. Навески пептона, хлористого натрия и агара в бумажных пакетиках. Прибор для определения рН колориметрическим методом (макро– и микро–Михаэлис). Раствор соды 10%-й. Пипетки. Штативы для пробирок. Пробирки и ватные пробки к ним. Вода дистиллированная в стаканчике для промыва пипеток. Вата. Спирт в капельнице. Электрическая плита для нагревания, плавления агара и растворения пептона. Автоклав. Сушильный шкаф. Фильтр Зейтца и др. оборудование.

Пояснения к занятию

Питательные среды

Культивирование (выращивание) микроорганизмов применяется для выделения их из объектов окружающей среды, количественного и качественного микробиологического анализа, для накопления и сохранения микробных клеток.

Среда, используемая в лабораторных условиях для культивирования микроорганизмов, называется питательной. К питательным средам предъявляют определенные требования: они должны содержать все необходимые питательные вещества (органогены, зольные элементы, микроэлементы, витамины) в

доступной для микроорганизма форме, должны быть изотоничны по отношению к микробной клетке, обладать буферными свойствами, иметь оптимальную вязкость, определенный окислительно-восстановительный потенциал, уровень аэрации, температурный режим. Обязательным условием является стерильность питательных сред, так как посторонние микроорганизмы изменяют свойства среды, затрудняют культивирование и изучение определенных микроорганизмов.

Универсальных сред, пригодных для всех видов микроорганизмов, не существует. Отдельные виды микробов в зависимости от особенностей обмена веществ нуждаются в различных питательных субстратах и условиях культивирования.

Для выращивания микроорганизмов используют разнообразные питательные среды, которые по составу подразделяют на натуральные (зерно, ломтики картофеля, моркови, молоко и т.д.), полусинтетические и синтетические.

Полусинтетические среды в своем составе, наряду с соединениями известной химической природы, содержат вещества неопределенного состава (мясопептонный бульон с глюкозой и фосфорнокислым калием и др.).

Синтетические среды содержат известные химические соединения в определенной концентрации (например, среда Чапека для культивирования грибов).

Широкое распространение получили так называемые *простые среды*, пригодные для многих видов микроорганизмов. К простым средам относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА). Пептон (продукт неполного гидролиза белка) и мясная вода, входящие в состав этих сред, служат источником азота, углерода, зольных элементов и факторов роста, необходимых микроорганизмам.

Сложные среды готовят, как правило, на основе простых, добавляя к ним питательные вещества, необходимые для более требовательных видов микроорганизмов.

По консистенции питательные среды бывают жидкими, полужидкими, плотными и сыпучими. К жидким средам относятся МПБ, сусло и др. Жидкие среды применяют для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, накопления биомассы или продуктов метаболизма.

Плотные среды используют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, диагностических целей и в ряде других случаев. Уплотнение сред достигается добавлением к жидким средам агар-агара и желатина.

Агар (малайское – желе) – плотный волокнистый полисахарид, получаемый из морских водорослей и образующий в водных растворах плотный гель. Большинство микроорганизмов не могут использовать агар в качестве источника углерода. Агар плавится в кипящей воде и застывает при температуре около 40⁰С. Агар добавляют к полужидким средам в количестве 0,5%, плотным – 2%.

Желатин – белковое вещество животного происхождения. Применение его как уплотнителя ограничено из-за низкой температуры разжижения (23 - 27⁰С). Обычно его добавляют к жидким средам в количестве 10 – 15%.

Плотными средами являются МПА, сусло-агар (СА), мясопептонный желатин (МПЖ).

Для ограниченного числа сред в качестве уплотнителя используется кремнекислый гель (синтетические среды для некоторых почвенных микроорганизмов).

Сыпучие среды применяют в промышленной микробиологии для культивирования продуцентов физиологически активных соединений, а также в коллекциях для сохранения культур микроорганизмов (автоклавированное пшено, кварцевый песок и др.).

В зависимости от задач исследования, кроме простых сред, используемых для культивирования многих видов микробов, применяют элективные и дифференциально-диагностические среды.

Элективные среды обеспечивают преимущественный рост одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или вовсе непригодны для других. Эти среды были предложены С.Н. Виноградским и М. Бейеринком и используются микробиологами-экологами для выделения микробов из мест естественного обитания, для получения накопительных культур определенного вида из материала, содержащего смешанную микрофлору.

Дифференциально-диагностические среды служат для дифференциации различных видов микроорганизмов. В состав этих сред обычно вводят вещества, позволяющие изучить особенности ферментов исследуемых культур. Такие среды получили широкое распространение в медицинской, санитарной и ветеринарной микробиологии, например при анализе состояния воды (посевы на среду Эндо с целью выявления кишечной палочки).

Условия культивирования микробов

Температура. Для оптимального развития микроорганизмов необходима температура, соответствующая видовым потребностям культуры. Большинство видов бактерий и плесневых грибов активно размножается при температуре 27 – 35⁰С (мезофилы). Группа холодолюбивых (психрофильных) микроорганизмов развивается при температуре от 0 до 20⁰С. Для теплолюбивых (термофильных) микроорганизмов оптимальная температура роста 45 – 65⁰С. При отклонении температуры от оптимальной развитие микроорганизмов задерживается. Для поддержания оптимальной температуры питательных сред и окружающей среды используют специальные приборы – термостаты либо термостатные комнаты. Для выращивания психрофильной микрофлоры применяют холодильные камеры.

Свет. Большинство микроорганизмов не нуждается в свете, а прямые солнечные лучи подавляют рост бактерий. Поэтому микроорганизмы культивируют в темноте. Свет необходим только для роста фототрофных микроорганизмов. Для выращивания микроводорослей и цианобактерий применяют флуоресцентные лампы дневного света.

Аэрация. Микроорганизмы-аэробы и факультативные анаэробы выращивают при доступе кислорода в обычных условиях воздушной среды на поверхности плотных и жидких сред. Однако возможно и глубинное культивирование

в толще жидкой среды. Для улучшения условий аэрации используют качалки, мешалки, продувают через толщу среды стерильный воздух.

Культивирование анаэробов проводят в бескислородных условиях, которые создаются различными приемами. Широко распространенными приемами являются: выращивание под высоким слоем жидкой среды; культивирование в вязких средах (добавляют 0,3% агара); выращивание в толще плотной среды (при использовании чашек Петри засеянную анаэробами агаризованную среду наливают в крышку чашки и, после того как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки заливают стерильным парафином); культивирование в средах с восстановителями (в среды добавляют цистеин, сульфид натрия, аскорбиновую кислоту и др.). Строгих анаэробов выращивают в специальных аппаратах – анаэроостатах или стеклянных вакуумных эксикаторах.

Активная кислотность среды. Большинство бактерий и актиномицетов лучше всего растет при рН, близком к 7,0. Микроскопические грибы предпочитают слабокислые среды, а уробактерии, денитрификаторы, холерный вибрион – слабощелочные или щелочные. Поэтому в приготовленных средах уровень рН регулируется. Измеряют рН сред различными способами: потенциометрическим, индикаторным (используют универсальный индикатор), колориметрическим (с помощью прибора Михаэлиса). В случае необходимости рН сред доводят до нужного значения растворами кислот, щелочей или солей, имеющих щелочную реакцию (сода).

Активная кислотность питательной среды, благоприятная для начального роста, достаточно часто меняется в процессе культивирования. Чтобы избежать нежелательных сдвигов рН в культурах микроорганизмов, применяют фосфатные буферы, вводят избыточное количество мела.

Методы стерилизации

Стерилизация является одним из необходимых приемов в микробиологической практике. Стерилизацией или обеспложиванием называется *полное уничтожение* микроорганизмов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Различают термическую и холодную стерилизацию.

Стерилизация прокаливанием на пламени (фламбирование). При этом методе все, что способно гореть, в том числе и микробы, сжигается. Такой метод применяется при стерилизации металлических инструментов, игл, петель, предметных стекол, а также горлышек колб, бутылок, пробирок.

Стерилизация сухим жаром. Производится в сушильных шкафах при температуре 160 – 170° С в течение 1 – 2 часов. Этим методом стерилизуют в основном стеклянную посуду (колбы, пробирки, пипетки, чашки Петри).

Кипячение. Простейший способ стерилизации игл, шприцев, хирургических инструментов. Проводится в специальных стерилизаторах в течение 10 – 15 мин. Добавление к воде 1 – 2% соды повышает стерилизующее действие.

Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование)

Производится в автоклаве. Автоклав – это паровой толстостенный котел с герметически закрывающейся крышкой (рис. 18).

Автоклав состоит из трех цилиндров: наружный кожух, наружный котел для воды и внутренний для пара и стерилизуемых материалов. В автоклав наливают



Рис. 18. Вертикальный автоклав: общий вид

дистиллированную воду через боковую воронку. После загрузки автоклава предметами, подлежащими стерилизации, закрывают крышку и завинчивают болтами постепенно и равномерно во избежание перекоса. Когда вода закипает, образуется пар. После установления непрерывной струи пара закрывают выводной кран и включают манометр. В результате этого давление в котле начинает постепенно повышаться. Когда стрелка манометра достигает нужного давления, засекают время и поддерживают давление на этом уровне 30 – 40 мин, а иногда и до 2 часов в зависимости от стерилизуемого объекта. Постоянное давление поддерживается на данном уровне благодаря наличию предохранительного клапана, который сбрасывает лишний пар. Давление в одну атмосферу соответствует 120 – 121° С.

По истечении срока стерилизации нагревание прекращают и дают автоклаву охладиться до тех пор пока стрелка манометра не упадет до нуля. Затем осторожно открывают пароотводный кран и только после выпуска пара открывают крышку.

Чтобы предметы остались сухими после стерилизации, их необходимо вынимать сразу после выпуска пара. В автоклаве можно стерилизовать посуду, резину, перевязочный материал, воду, питательные среды, выдерживающие высокую температуру.

Стерилизация текущим паром. Производится в кипятыльнике Коха, который представляет собой металлический цилиндр, обшитый снаружи плохо проводящим тепло материалом. На дно кипятыльника наливается вода, а стерилизуемые предметы помещаются на специальных подставках над поверхностью воды. Началом стерилизации считают момент энергичного выхода пара. Стерилизация в кипятыльнике Коха проводится при 100°С 30 – 40 мин, трехкратно, с промежутком в 24 часа. Повторная стерилизация необходима потому, что при температуре 100°С уничтожаются только вегетативные клетки и отдельные споры. Для уничтожения всех спор в промежутках между стерилиза-

циями стерилизуемый материал помещают в термостат с оптимальной для развития микробов температурой. За это время споры прорастают и вегетативные клетки уничтожаются повторной стерилизацией.

Стерилизация фильтрованием. Проводится через мелкопористые фильтры, не пропускающие клетки микроорганизмов (свечи Шамберлана, фильтры Зейтца). Фильтрование проводится в стерильную посуду через предварительно простерилизованный фильтр. Для ускорения фильтрования применяется вакуум, который создается с помощью насосов, отсасывающих воздух из колбы – приемника. Стерилизация фильтрованием применяется для тех питательных сред, которые содержат легко разлагающиеся при нагревании вещества (сыворо́тки, антибиотики, витамины). В фильтры могут проходить только ультрамикробы (вирусы, бактериофаги, L–формы бактерий).

Пастеризация. Этот прием еще называют частичной стерилизацией. Проводится при температуре 60 – 80° С в течение 30 – 40 мин. При такой температуре погибают только вегетативные клетки, но не споры. Чем ниже температура пастеризации, тем больше требуется времени для уничтожения бактерий.

Пастеризацию применяют в тех случаях, когда необходимо освободиться от бесспорных форм микроорганизмов, например в молоке. Пастеризованные продукты или среды подлежат кратковременному хранению и лучше при низкой температуре.

Тиндализация. Представляет собой прием трехкратной пастеризации с промежутками около суток, в течение которых споры прорастают. Таким путем можно получить стерильную среду даже при невысокой температуре (до 80°С).

Дезинфекция. Данный способ стерилизации заключается в применении химических веществ (3 – 5 % раствора фенола, 0,5 – 2% раствора формалина, 4 – 10% раствора хлорной извести, 5% раствора перекиси водорода или марганцовокислого калия). Такие вещества называются антисептиками.

Ультрастерилизация. Нагревание продукта до 150° С в течение одной сек. Проводится в трубчатых аппаратах путем введения в них чистого пара. Ультрастерилизация используется для обезвреживания молока, при этом сохраняется витамин С и удаляются некоторые летучие вещества кормового и стойлового происхождения.

Воздействие ультрафиолетовыми лучами. Чаще всего применяется для стерилизации боксов и столов. При действии на микроорганизмы в определенных дозах ультрафиолетовое излучение вызывает гибель бактерий. Наиболее эффективными являются лучи с длиной волны 2600 А. В качестве источника ультрафиолетового излучения обычно используют специальные лампы. Излучателем в этих лампах служит электрический разряд (дуга), возникающий в парах ртути низкого давления.

Самостоятельная работа

1. Ознакомление с коллекцией питательных сред и некоторыми компонентами (агар, пептон, желатин).

2. Приготовление простых питательных сред МПБ и МПА, определение их активной кислотности.

3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Ознакомление с коллекцией питательных сред и некоторыми компонентами (агар, пептон, желатин).

В процессе работы знакомятся с простыми питательными средами (МПБ в пробирках; МПА в пробирках скошенный, столбиком; сусло пивное; среда Чапека). Изучают образцы компонентов питательных сред – агар-агар (в чашках Петри), пептон, желатин (в пробирках). Знакомятся с аппаратами для стерилизации (автоклав, сушильный шкаф, фильтр Зейтца) и культивирования микробов (термостат, анаэробостат).

Работа 2. Основой простых питательных сред МПА и МПБ служит мясная вода. Ее готовят из доброкачественного говяжьего или конского мяса. Кости, сухожилия и жир из него удаляют. Мясо пропускают через мясорубку, взвешивают, заливают двойным количеством водопроводной воды и оставляют на 24 часа в прохладном месте для экстрагирования. Экстракт отделяют фильтрованием и кипятят в течение часа. Затем фильтруют через бумажный фильтр и доливают водопроводной водой до первоначального объема. Разливают по колбам и стерилизуют в течение 30 мин при температуре 120° С.

Для ускорения процесса фарш заливают двойным количеством воды и в течение часа нагревают (температура 50° С), затем проводят фильтрование. Готовая мясная вода имеет слабокислую реакцию (рН 6,8) и соломенно-желтый цвет. Мясную воду для занятия заранее готовит лаборант.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) – готовят на мясной воде. К ней добавляют 1% пептона и 0,5% поваренной соли (химически чистой). Кипятят до растворения пептона, все время помешивая. Величину рН определяют колориметрическим методом. Реакцию среды доводят до 7,4 – 7,6, подщелачивая 10%-м раствором едкого калия или насыщенным раствором соды. После добавления щелочи бульон еще раз кипятят, фильтруют через бумажный фильтр и сразу же разливают по пробиркам и стерилизуют в течение 20 мин при температуре 120° С.

Мясо-пептонный агар (МПА) – для приготовления МПА к мясопептонному бульону добавляют 2% агар-агара. Агар плавят в бульоне, доводя его до кипения. Во время плавления среду помешивают, чтобы агар-агар не подгорал.

Расплавленный МПА в горячем состоянии быстро фильтруют через марлю с ватой и разливают по пробиркам. В пробирки для приготовления скошенного МПА наливают 5 мл, для приготовления столбиков 10 мл среды. После разлива среды пробирки закрывают пробками и стерилизуют при 120° С в течение 20 – 30 мин.

Студенты работают группами по 2 человека (сторона стола). Две группы студентов готовят МПБ и две – МПА. Стерилизацию готовых сред в автоклаве выполняет лаборант (!).

В протоколе исследования следует записать классификацию питательных сред по составу, консистенции и назначению, методы стерилизации питательных сред.

Контрольные вопросы

1. Каким требованиям должны удовлетворять питательные среды?
2. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?
3. Какие вещества служат для уплотнения сред?
4. Что такое элективная среда?
5. Какие условия нужны для успешного выращивания микроорганизмов?
6. Какими способами стерилизуют питательные среды?

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 54 – 61.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 40 – 47.

Занятие 6. Количественный учет микроорганизмов в почве, воде и воздухе

Цель занятия. Определить общее количество живых микроорганизмов в 1 г почвы и 1 мл воды, используя метод разведения, оценить содержание клеток микробов в 1 м³ воздуха помещений методом оседания по Коху и с помощью прибора Кротова.

План занятия. 1. Ознакомление с методикой отбора проб почвы и воды для микробиологического анализа.

2. Изучение традиционной технологии количественного учета микроорганизмов в почве и воде методом разведений.

3. Изучение технологии микробиологического анализа воздуха методом оседания по Коху и с помощью прибора Кротова.

4. Самостоятельная работа: посев разведений почвенной суспензии и водопроводной воды в чашки Петри на МПА; посев микроорганизмов из воздуха различных помещений на поверхность МПА в чашках; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы: чашки Петри стерильные, завернутые в бумагу. Пипетки стерильные, снабженные ватками и завернутые в бумагу. Колбы Эрленмейера стерильные для забора водопроводной воды. Колбы Эрленмейера с 99 мл стерильной воды. Пробирки со стерильной водой (по 9 мл в каждой) в штативах. Среда МПА (столбиком), по три пробирки на двух студентов. Спиртовки. Прибор Кротова. Навески почвы (по 1 г) в пакетиках из пергаментной бумаги. Пинцет и вата, смоченная спиртом, для обжига водопроводного крана. Карандаши по стеклу.

Пояснения к занятию

Количественный учет микроорганизмов в объектах окружающей среды необходим при санитарно-гигиенических и экологических исследованиях для моделирования природных систем и разработки основ управления природными процессами, а также при контроле качества окружающей среды.

Методика отбора проб почвы и воды

Почва – основная среда обитания для многих микроорганизмов. Она содержит все необходимые для их роста и развития органические и минеральные вещества, достаточное количество влаги и воздуха. Вместе с тем, почва – среда чрезвычайно гетерогенная и микроорганизмы распространены в ней неравномерно.

Чтобы получить правильное представление о численности почвенных микроорганизмов, следует образцы почвы отбирать из различных мест, двигаясь по диагонали исследуемого участка (обычно не менее чем в 5 точках, лучше 16 – 20 индивидуальных образцов) на разной глубине (глубина отбора образцов определяется целью исследования; обычно отбирают верхний, наиболее биогенный слой почвы - 0 – 20 см). Отбор проб проводят стерильным инструментом (почвенный бур, лопатка). Каждый раз после отбора очередной пробы рабочую поверхность инструмента стерилизуют в пламени. Пробы почвы помещают в стерильные пакеты из крафт-бумаги (ватман), масса отобранной почвы должна быть не менее 200 г. Взятые образцы немедленно доставляют в лабораторию, где из индивидуальных проб готовят общую пробу, смешивая образцы в стерильной банке. Образцы должны быть проанализированы в течение 24 часов с момента их отбора. Если это невозможно сделать, то их высушивают при комнатной температуре, доводя до воздушно-сухого состояния, помещают в стерильные пакеты (бумажные, но не полиэтиленовые!) и хранят в холодильнике при +4 – 5⁰С.

Отбор проб воды для количественного учета микробов имеет свои особенности. Следует иметь в виду, что вода, как правило, менее богата микроорганизмами, чем почва. Количество сапротрофных микроорганизмов в воде колеблется от единичных клеток до нескольких миллионов в 1 мл.

Пробы воды для микробиологического исследования отбирают с соблюдением правил стерильности в стерильную стеклянную посуду с притертыми пробками. Перед взятием пробы из водопроводного крана воду спускают 5 – 10 мин, края крана обжигают пламенем. Из открытых водоемов пробы воды отбирают на уровне 10 – 15 см от поверхности. В проточных водоемах пробы отбирают у берега и в центре течения, используя специальные приборы – батометры.

Микробиологический анализ воды выполняют не позднее 2 ч с момента взятия или не позднее 6 ч при хранении пробы при 4⁰С.

Количественный учет микроорганизмов в почве и воде методом разведений

Из средней пробы на весах с соблюдением условий стерильности берут 1г почвы. Полученную навеску помещают в стерильную фарфоровую чашку, увлажняют до пастообразного состояния и растирают в течение 5 мин резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке с целью разрушения почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц. Обработанную таким образом навеску переносят в колбу с 99 мл стерильной воды (получается разведение 1:100). Почвенную суспензию в колбе можно энергичными

движениями взболтать в течение 5 мин (но так, чтобы не смочить пробку!). Из базового разведения один миллилитр переносят стерильной пипеткой в пробирку с 9 мл стерильной воды (получается разведение 1:1000). Затем операцию повторяют. Готовя последующее разведение, каждый раз меняют использованную пипетку на новую, стерильную. Разведения почвенной суспензии готовят для того, чтобы при посеве на чашке Петри выросло от 50 до 150 колоний (рис. 19).

Схема приготовления разведений

1. 1 г почвы + 99 мл стерильной воды – 1:100
2. 1 мл разведения 1:100+9 мл стерильной воды – 1: 1000
3. 1 мл разведения 1:100+9 мл стерильной воды – 1:10000
4. 1 мл разведения 1:100+9 мл стерильной воды – 1:100000

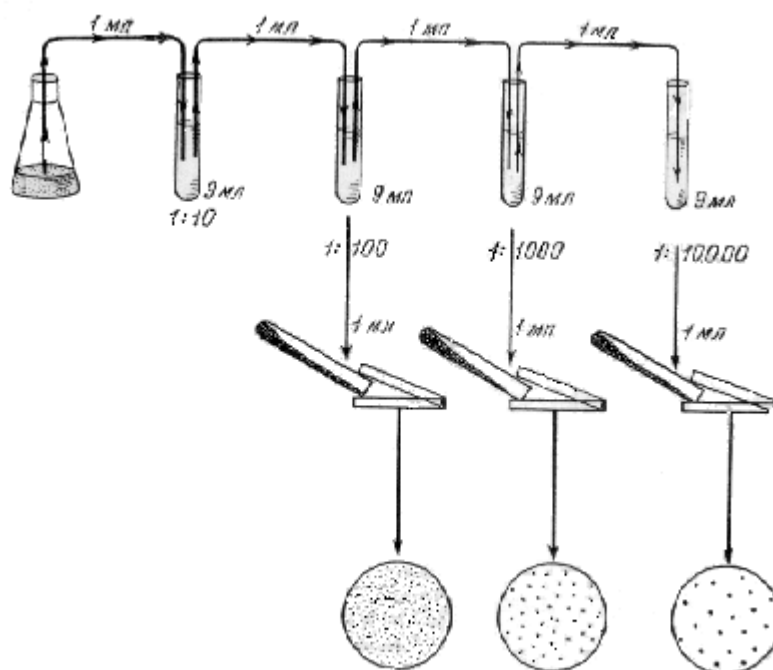


Рис. 19. Схема посева почвы глубинным способом из разведений

Из последних разведений по 1 мл вносят в стерильные чашки (каждым разведением засевают не менее 3 чашек, лучше 4 - 5), после чего заливают по 10 мл расплавленного и охлажденного до 45°С МПА. Чашки с застывшей средой переворачивают вверх дном и ставят в термостат. Через 3 – 4 дня подсчитывают выросшие колонии, находят среднеарифметическое число клеток и умножают это число на разведение, из которого был произведен посев. Результаты обрабатывают статистически, рассчитывая ошибку среднего арифметического, среднее квадратическое отклонение и коэффициент вариации.

При исследовании воды открытых водоемов высевают по 1 мл из предварительно приготовленных в стерильной воде десятикратных разведений исследуемой пробы (10^{-3} и более в зависимости от предполагаемого загрязнения). Разведения (по 1 мл) вносят стерильной пипеткой в пустые стерильные чашки Петри, в которые затем заливают расплавленный теплый МПА с температурой 45 – 46° С. Воду и МПА тщательно перемешивают и после застывания среды выдерживают чашки в термостате при 37°С. Затем подсчитывают выросшие колонии.

Общее число колоний, выросших в чашках Петри, умножают на разведения, затем выводят среднее арифметическое число колоний и таким образом устанавливают микробное число исследуемой пробы. Для воды определяют микробное число (общее количество микроорганизмов) и количество бактерий группы кишечной палочки (коли-титр и коли-индекс), а также другие показатели.

Количественный учет микробов в воздухе

Хотя воздух и не является средой обитания микроорганизмов, тем не менее количественный и качественный состав микрофлоры воздуха весьма разнообразен. Он зависит от степени загрязнения воздуха минеральными и органическими взвешиваемыми, температуры, осадков и других факторов. Чем больше в воздухе пыли, тем больше микробов, которые адсорбируются на ней.

В воздухе закрытых помещений микробов значительно больше, чем в открытых воздушных бассейнах, особенно зимой, при недостатке солнечного света и неудовлетворительном проветривании. Состав микрофлоры и количество микроорганизмов, обнаруживаемых в 1 м³ воздуха, зависят от санитарно-гигиенического режима, числа находящихся в помещении людей и других условий.

Учет микробов в воздухе проводят *методом оседания по Коху*. Это простейший метод бактериологического исследования воздуха, который основан на оседании (седиментации) бактериальных частиц и капель под влиянием силы тяжести на поверхности агара открытой чашки Петри. Чашки с МПА экспонируют 5 – 10 мин в зависимости от предполагаемого уровня бактериального загрязнения.

Метод оседания дает грубое, ориентировочное представление о количестве микроорганизмов в воздухе, так как на открытых чашках плохо улавливаются тонкодисперсные фракции бактериальных капель и пылевых частиц.

Для определения микробного числа воздуха подсчитывают число колоний на чашке Петри, учитывая, что за 5 минут с поверхностью питательной среды при площади чашки Петри примерно 100 см² соприкасается 10 л воздуха. Количество микробов в 1 м³ воздуха устанавливают по формуле:

$$X = \frac{\text{Число колоний} * 1000}{10} ;$$

где X – количество клеток в 1 м³ воздуха, 1000 – объем воздуха, л, 10 - объем воздуха, из которого происходит оседание микробов за 5 мин, л.

Гораздо более надежные результаты бактериологического анализа воздуха получают с помощью *прибора Кротова*, который состоит из приспособления для отбора проб воздуха, микроманометра и электрического механизма. Крышка приспособления для отбора воздуха имеет радиально расположенную щель, через которую поступает воздух и, соприкасаясь с поверхностью питательной среды, оставляет на ней клетки микроорганизмов. Чашка Петри с питательной средой вращается электромотором (прибор включают на 1 мин), засасываемый

через щель воздух выходит через штуцер, на котором обозначено количество литров воздуха, прошедшее за 1 минуту работы прибора.

Основной недостаток прибора состоит в том, что он нуждается для работы в электроэнергии; это ограничивает возможности его применения для исследования атмосферного воздуха.

В атмосферном воздухе количество клеток микроорганизмов определяют с помощью приборов, в которых аэрозоль улавливается в жидкую среду. Приборы представляют собой стеклянные емкости, в которые через отверстия в пробке пропущены две трубки. Одна трубка кончается чуть ниже пробки и соединена с аспиратором, другая опущена на дно цилиндра, куда поступает исследуемый воздух. В цилиндр наливают стерильный изотонический раствор хлорида натрия или водопроводную воду и через нее просасывают определенный объем воздуха. В качестве аспиратора может быть использован насос. Посев жидкости производят на питательный агар. На МПА засевают по 0,2 мл улавливающей жидкости.

Самостоятельная работа

1. Определение общего количества микроорганизмов в почве методом посева разведений почвенной суспензии на МПА.
2. Определение микробного числа водопроводной воды.
3. Определение содержания микроорганизмов в воздухе лаборатории и учебного корпуса методом седиментации и с помощью прибора Кротова.
4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Определение общего количества микроорганизмов в почве методом посева разведений.

Студенты работают группой (по 2 – 4 человека). Для посева почвенной суспензии на МПА берут заранее подготовленную упаковку чашек Петри (4 шт. в упаковке), упаковку пипеток (4-5 шт.), 3 пробирки со стерильной водой, колбу с 99 мл стерильной воды, образец почвы в пергаментном пакете. В целях упрощения процедуры анализа растирание навески почвы в фарфоровой ступке можно исключить.

Три чашки подписывают карандашом по стеклу для посева почвы: на одной указывают разведение 1:1 000, на двух других – 1:10 000. На всех чашках надписывают дату посева, номер подгруппы, вариант (почва). Четвертую чашку каждая студенческая группа подписывает для посева воздуха (номер подгруппы, фамилию, дату и место посева) и сразу же заливает в нее 15 – 20 мл расплавленного МПА (лаборант до начала занятия разогревает среду на водяной бане). Следуя приведенным выше методическим указаниям, производят глубокий посев почвенной суспензии. После заливки чашек питательной средой и ее застывания, чашки переворачивают дном вверх, чтобы накопившаяся при застывании среды конденсационная вода не стекала с крышки и не размывала формирующиеся колонии. Посевы помещают в термостат для культивирования при температуре 25 – 27⁰С.

Работа 2. Определение микробного числа водопроводной воды.

При посеве водопроводной воды схема анализа несколько видоизменяется: студенты засевают одну чашку исходной водой (1 мл), т.е. той, которую отбирают из крана в стерильную колбу, и готовят два разведения – 1:10 и 1:100. По одному миллилитру каждого разведения водопроводной воды засевают на чашки Петри. В общих чертах технология посева воды такая же, что и почвы. Чашки с посевами воды инкубируют в термостате при 37⁰С.

Работа 3. Определение содержания микроорганизмов в воздухе.

Стерильную чашку Петри с застывшей средой (МПА) ставят в том месте (лаборатория, коридор, лестничная площадка и т.п.), где предполагается исследовать воздух, и открывают на 10 минут. Крышку переворачивают внутренней стороной вверх и осторожно опускают рядом с чашкой. За 10 мин происходит оседание микробов на поверхность питательной среды. После этого чашку закрывают и помещают в термостат до следующего занятия.

В протоколе исследования следует записать методику отбора проб почвы и воды для бактериологического анализа, методику количественного учета микроорганизмов в почве.

Контрольные вопросы

1. Как выполняется отбор почвы для микробиологического анализа?
2. Как выполняется отбор воды для микробиологического анализа?
3. Какие способы бактериологического анализа воздуха Вы знаете?
4. Для чего готовят разведения почвенной суспензии, воды?
5. Опишите методику микробиологического анализа почвы.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 68 – 70, 94 – 103.
2. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 48 – 52.

Занятие 7. Микробиологический анализ состояния почвы, воды и воздуха. Выделение чистых культур микроорганизмов

Цель занятия. Ознакомление с санитарно-микробиологической оценкой объектов окружающей среды, понятием «чистая культура», задачами и методами ее выделения в лабораторной практике.

План занятия. 1. Учесть результаты бактериологического исследования почвы, воды и воздуха.

2. Провести макро– и микроизучение выросших колоний в посевах (сделать описание двух типов колоний).

3. Освоить способы посевов и пересевов с целью получения чистых культур.

4. Сделать пересев двух различных типов колоний на МПА (скошенный агар) и МПБ.

Оборудование и материалы: По две пробирки МПБ и МПА на каждого студента для посевов. Микробиологические петли, иглы. Карандаши по стеклу.

Предметные стекла. Спиртовки. Пинцеты. Микроскопы. Иммерсионное масло. Фуксин основной в капельницах. Чашки сливные с мостиками. Тетради для высушивания мазков. Таблицы: санитарная оценка качества воздуха, характер роста колоний на питательных средах, схема посева микроорганизмов на питательные среды.

Пояснения к занятию

Учет результатов бактериологического исследования почвы, воды и воздуха

Почва – наиболее богатый микроорганизмами объект окружающей среды. В 1 г почвы может содержаться от 1 до 10 млрд клеток микроорганизмов. В почве размножаются различные физиологические группы бактерий - нитрификаторы, денитрификаторы, аммонификаторы, азотфиксаторы, целлюлозоразлагающие микроорганизмы и многие другие. При посеве почвенной суспензии на МПА выявляют исключительно группу аммонифицирующих микроорганизмов, да и то далеко не полностью. Поэтому в образцах воздушно-сухой полевой или огородной почвы общая численность микроорганизмов (по данным посевов на МПА) в 1 г не превышает 2 – 3 млн клеток.

Для патогенных бактерий почва не является средой обитания. В ней они быстро погибают в результате воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и микробов-антагонистов. Однако некоторые опасные возбудители инфекций могут сохраняться в почве годами и даже десятилетиями. Это споровая микрофлора - бациллы (сибирская язва) и клостридии (возбудители столбняка, ботулизма и др.).

Санитарную оценку состояния почвы дают по общему количеству микроорганизмов в 1 г почвы (микробное число), наличию в почве кишечной палочки (коли-титр почвы) и *Clostridium perfringens* (перфрингенс-титр) – санитарно-показательных микроорганизмов, указывающих на фекальное загрязнение почвы и возможное присутствие в ней патогенной микрофлоры. Незагрязненной считается почва, для которой коли-титр (наименьшее весовое количество почвы, в котором обнаруживается кишечная палочка) – 1 г и выше; перфрингенс-титр (наименьшее весовое количество почвы, в котором обнаруживается *Clostridium perfringens*) – 0,1 г и выше; микробное число меньше 5 млн клеток/г почвы.

При исследовании воды определяют микробное число и количество бактерий группы кишечной палочки (коли-титр, коли-индекс). Кишечная палочка является индикатором фекального загрязнения воды болезнетворными микробами – возбудителями кишечных инфекций человека.

Микробное число *определяется числом колоний, которые вырастают на МПА при 37°С в течение 24 часов из посева 1 мл воды.* Число сапрофитных микроорганизмов, вырастающих на МПА, обычно соответствует степени загрязненности воды органическими веществами и косвенно характеризует ее состояние.

Согласно ГОСТ 2874–73 на питьевую воду, общее количество микробов (микробное число) в 1 мл при посеве неразведенной воды и выдерживании ее 24 часа при 37°С:

Хорошая вода – до 100

Сомнительная вода – от 100 до 500

Плохая вода – от 500 и более.

Коли–индекс – это число кишечных палочек, обнаруженных в 1 л исследуемой воды (по международному стандарту в 100 мл).

Коли–индекс определяют методом мембранных фильтров, через которые фильтруют определенный объем воды (100 или 1000 мл). Затем фильтр накладывают на поверхность среды Эндо в чашку Петри. После культивирования при температуре 37° С через 24 часа подсчитывают колонии красного цвета, характерные для кишечной палочки на этой среде.

Коли–титр – это наименьший объем воды, содержащий кишечную палочку. Определяется методом бродильных проб. Данные методы основаны на способности кишечной палочки развиваться при повышенной температуре 43 – 44°С и сбраживать сахара (маннит, глюкозу) с выделением газа. Существуют двух– и трехэтапные бродильные методы с использованием среды Булира, среды Эйкмана и розоловой среды.

В одном литре воды при определении методом мембранных фильтров кишечных палочек должно быть **не более трех**.

При использовании бродильных проб титр кишечной палочки должен быть **не менее 300**. К водопроводной воде в городах с населением свыше 1 млн человек должны предъявляться более высокие требования: **коли–индекс – 2, коли–титр – 500**. Вода открытых водоемов считается хорошей при коли–титре **100**, коли – индексе **10**.

Санитарная оценка воздуха: в жилых помещениях чистым воздух считается, если в 1 м³ летом содержится **1500** (и менее), а зимой – **4500** (и менее) клеток. В загрязненном воздухе соответственно **2500** и **7000** микробов (по Шарифу А.). Патогенные микроорганизмы могут оказывать аллергенное воздействие на отдельных восприимчивых индивидуумов. В связи с этим установлены гигиенические нормативы на содержание живых клеток микроорганизмов в воздухе производственной зоны. ПДК на живые клетки разных видов дрожжей р. *Candida* – 300 – 1000 клеток в 1 м³ воздуха; ПДК бактерий р. *Artrobacter* – 3000 клеток/м³; р. *Vacillus* – 2000 клеток/м³.

Выделение микроорганизмов в чистую культуру

Под **чистой культурой** понимается совокупность клеток с одинаковым генотипом, т.е. состоящая из *микроорганизмов одного вида*. Чистая культура, произошедшая из одной единственной клетки, называется клоном.

Выделение микроорганизмов в чистую культуру, свободную от других видов микробов, необходимо для изучения их особенностей и широко используется в микробиологической практике.

В естественных условиях различные объекты (почва, вода и др.) содержат смешанную микрофлору. Поэтому при изучении состава микрофлоры объекта окружающей среды исследование обычно начинают с выделения микроорганизмов в виде чистых культур.

Существует несколько методов получения чистых культур. Все они основаны на выделении из смеси микроорганизмов одной микробной клетки.

Метод выделения чистых культур путем изоляции микроорганизмов из одной колонии на плотную среду носит название *метода чашечных культур Коха*.

При выделении чистой культуры методом Коха основным условием является предварительное разведение концентрации микроорганизмов в исследуемом материале с таким расчетом, чтобы при посеве его на питательной среде выросли изолированные колонии. Этого можно добиться путем истощающего посева исследуемого материала на плотной питательной среде (метод истощающего мазка или штриха) либо разведением материала в стерильной водопроводной воде перед посевом.

Полученные изолированные колонии исследуют визуально и под микроскопом (чтобы убедиться в морфологической однородности клеток), выполняют их описание. При описании колоний микроорганизмов отмечают следующие морфологические и культуральные признаки: размер колоний – их диаметр в мм; форму колоний – округлая, неправильная, ризоидная, амёбовидная, концентрическая и др.; цвет колоний – белый, желтый, розовый и т.д. – и способность выделять пигмент в среду; поверхность колоний – гладкая, складчатая, шероховатая, бугристая и др.; оптические свойства – прозрачная, полупрозрачная, непрозрачная, блестящая, матовая и т.д.; профиль колоний – плоский, приподнятый, каплевидный, вогнутый, кратерообразный и др.; край колоний – ровный, извилистый, зубчатый, лопастной, волнистый, реснитчатый, ворсинчатый и др.; консистенция колонии – вязкая, слизистая, пастообразная, кожистая, крошащаяся и т.д.

Далее пересевают культуру из колонии в пробирки (рис. 20) с жидкой и плотной питательной средой (скошенный агар и агар столбиком). Пересев проводят следующим образом.

1. Захватывают пробирку средним пальцем левой руки так, чтобы скошенная поверхность агара была обращена вверх.

2. Фламбируют петлю.

3. Приоткрывают крышку чашки Петри, берут петлей биомассу из колонии и закрывают крышку.

4. Быстро делают посев по поверхности косога агара. Движение петли во время посева зигзагообразное, чтобы обеспечить большую площадь питания для микроорганизма. Иногда отсевают и прямым штрихом.

5. Делают на пробирке надпись, число, номер колонии и ставят посев в термостат.

Посев в столбик агара делают уколом, используя бактериологическую иглу. Пробирку с плотной питательной средой при этом переворачивают дном вверх. Все манипуляции выполняют возле пламени горелки.

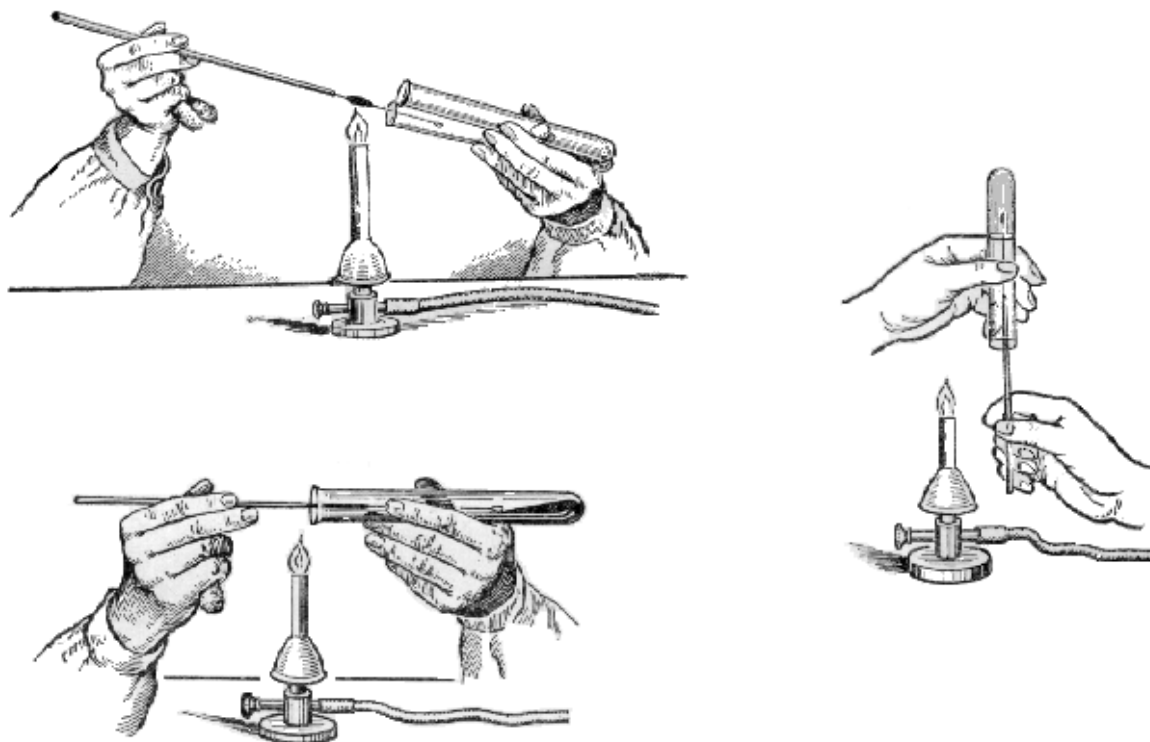


Рис. 20. Методика посева и пересева культуры микроорганизма на жидкую и плотную питательные среды

Применяют также выделение чистой культуры из одной клетки *капельным методом*. Для этого подготавливают такое разведение культуры микроорганизма в питательной среде, чтобы в небольшой капле среды находились единичные клетки. На поверхность стерильного покровного стекла с помощью стерильной стеклянной палочки наносят ряды мелких капель среды, содержащей клетки.

Стекло переворачивают и помещают над лункой предметного стекла. Затем все капли просматривают под микроскопом и маркируют те из них, в которых находится только одна клетка.

Стекло помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и ставят в термостат; клетка размножается, образуя микроскопическую колонию. Полученную колонию пересеваяют в пробирку с питательной средой.

Выделение чистой культуры капельным методом в основном используется при работе с крупными клетками (дрожжи, споры грибов).

Самостоятельная работа

1. Определение общего количества микроорганизмов в почве, микробного числа водопроводной воды, содержания микроорганизмов в воздухе по результатам посева на МПА.

2. Макро- и микроизучение выросших колоний в посевах (сделать описание двух типов колоний).

3. Выделение в чистую культуру на МПА и МПБ микроорганизмов из двух различных колоний.

4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Определение общего количества микроорганизмов в почве, воде и воздухе по результатам посева на МПА.

Подсчет количества колоний на чашке проводят обычно со дна чашки в проходящем свете. На месте подсчитанной колонии карандашом по стеклу ставится точка. Колонии, внутри которых или под которыми отмечен рост другой колонии, считают как отдельные. Условно принимают, что каждая колония возникла из одной клетки.

Количество колоний подсчитывают на всех чашках и сразу же умножают на степень разведения, которым была засеяна чашка. Затем находят среднее арифметическое по трем чашкам, которое и является показателем содержания микроорганизмов в 1 г почвы.

По аналогичной методике определяют микробное число воды, но в чашке, засеянной исходной водой, количество зарегистрированных колоний на степень разведения не умножают.

При определении содержания микроорганизмов в 1 м³ воздуха пользуются приведенной выше формулой. Результаты расчетов по всем трем объектам окружающей среды сводят в таблицу.

Работа 2. Макро– и микроизучение выросших колоний в посевах.

Студент выбирает в закрытых чашках Петри две колонии для выделения в чистую культуру и отмечает их карандашом по стеклу. Сначала колонии исследуют невооруженным глазом, а затем с помощью окуляра от микроскопа. Выбранные колонии не должны соприкасаться с другими колониями, внутри и под ними (в толще агара) не должно быть роста посторонних микроорганизмов. Описывают цвет колонии, форму, поверхность, профиль, характер края и т.д. по приведенной ниже схеме.

Схема описания бактерий на плотной питательной среде

Дата выделения _____

Рост на МПА (возраст) _____

Величина: диаметр до 1 мм: точечные, росинчатые.

диаметр более 4 мм: крупные.

Форма: круглая, эллипсовидная, неправильная, корневидно-разветвленная.

Профиль: выпуклый, плоский, с кратерообразным центром.

Поверхность: гладкая, ровная, блестящая, морщинистая и т. д.

Край: ровный, волнистый, лопастной, зубчатый, бахромчатый и т. д.

Консистенция: слизистая, вязкая, крошковидная и т. д.

Цвет: желтый, белый, серый, красный и т. д.

После описания из колонии готовят окрашенный препарат (мазок на стекле) и рассматривают под микроскопом. Внешний вид клеток зарисовывают в тетради и дают описание их морфологических особенностей по схеме.

Морфология клетки (микроскопия)

Форма: кокки или палочки.

Расположение: одиночные, парами, цепочки, нити и др.

Концы: закругленные, срезанные, заостренные и др.

Споры: образуются или нет.

Работа 3. Из описанных колоний производят отсев бактерий на поверхность скошенного агара (МПА в пробирках) и в толщу жидкой питательной среды (МПБ в пробирках). Способы посевов и пересевов показаны на рисунке 20. Пробирки подписывают - № группы, фамилия, дата посева – и ставят в термостат до следующего занятия.

В протокол исследования заносят таблицу с результатами определения численности микроорганизмов в почве, воде и воздухе. Под таблицей делают письменные выводы об уровне бактериальной обсемененности объектов и их санитарном состоянии. Кроме этого, в протоколе записывают этапы выделения чистой культуры и зарисовывают микроскопическую картину мазка.

Контрольные вопросы

1. Как определить количество микроорганизмов в почве и воде по результатам посева на плотную среду?
2. Как определить количество микробных клеток в воздухе при посеве методом Коха?
3. Какие критерии санитарной оценки почвы, воды и воздуха Вы знаете?
4. Что представляют собой чистая и смешанная культуры микроорганизмов, с какой целью микроорганизмы выделяют в виде чистых культур?
5. Какие признаки колоний учитывают при изучении культуральных свойств бактерий.
6. Объясните принцип выделения чистых культур по методу Коха.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 61 – 68, 70, 95 – 96, 102.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 49 – 56.

Занятие 8. Идентификация чистой культуры бактерий. Дифференциально-диагностические методы окраски

Цель занятия. Исследование выделенной чистой культуры бактерии, ознакомление с физиологическими свойствами чистой культуры и ее идентификацией, дифференциально-диагностическим методом окраски по Граму.

План занятия. 1. Ознакомление с методикой изучения чистой культуры бактерий.

2. Изучение дифференциально-диагностического способа окраски по Граму.
3. Изучение методики определения размеров бактериальных клеток.

4. Самостоятельная работа: исследование чистоты (однородности), выделенной на скошенном МПА культуры бактерий; окраска выделенной культуры и контрольного мазка из баксмеси по Граму; определение размеров клеток; ознакомление с методами изучения физиологических свойств бактерий.

Оборудование и материалы. Пробирки со смесью культур *Bac. megaterium* и *E. coli*. Микробиологические петли. Капельницы с растворами красителей: генциана фиолетового фенолового, фуксина основного фенолового (Циля). Раствор Люголя. Банка из темного стекла с фильтровальной бумагой, пропитанной генциановым фиолетовым по Синеву. Этиловый спирт. Сливные чашки с мостиками. Вода в колбах для смыва красителя с мазков. Стекла предметные (в том числе с луночкой) и покровные. Карандаши по стеклу. Пинцеты анатомические. Спиртовки. Микроскопы. Объект-микрометры и окуляр-микрометры. Иммерсионное масло. Тетради для высушивания мазков. Демонстрационные посева культур на диагностических средах. Выделенные студентами культуры неидентифицированных микроорганизмов. Таблицы: техника окраски по Граму, этапы идентификации культур бактерий.

Пояснения к занятию

Студенты изучают чистоту неизвестной культуры, выросшей изолированно на скошенном МПА: внешний вид посева, его однородность. Для этого повторно готовят окрашенный препарат (окраска по Граму) из выделенной культуры и сравнивают полученную микроскопическую картину с рисунком, выполненным на предыдущем занятии, а также с описанием культуры в тетради. Если культура состоит из бактерий, однородных по культуральным и морфологическим свойствам, производят посев данного вида бактерий на дифференциально-диагностические среды для изучения физиологических свойств. Рост культуры на диагностических средах позволяет определить ферментативные свойства и установить вид бактерий.

Студенты знакомятся с особенностями роста бактерий на дифференциальных средах по демонстрационным посевам и выполняют описание роста культуры на МПБ. По результатам исследования морфологических, культуральных и физиологических свойств чистой культуры идентифицируют неизвестный вид бактерий, пользуясь определителями.

На этом занятии студенты изучают важнейший дифференциально-диагностический способ окраски по Граму, который нашел широкое применение в практике работы бактериологических лабораторий. Окраска по Граму необходима во всех случаях, когда требуется выполнить идентификацию микроорганизма на уровне вида.

По способности окрашиваться по методу Грама все бактерии делят на грамположительные (грам+) и грамотрицательные (грам-). Способность бактерий окрашиваться по Граму связывают с молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки бактерий. Исход окраски по Граму зависит

от состава микробных клеток, свойств цитоплазмы, среды обитания и возраста культуры. У грамположительных микробов цитоплазма более кислая (рН 2 – 3), у грамотрицательных рН выше (4 – 5). В клеточной стенке грамположительных микробов содержится пептидогликан муреин, который в кислой среде в присутствии йода образует прочное соединение с основными красками (генциан-виолетом), даже после воздействия спиртом клетки не теряют краску и остаются окрашенными в фиолетовый цвет.

У грамотрицательных микробов не образуется прочного соединения основных красителей с белками клеток, т.к. в клеточной стенке у них почти нет муреина (вместо него липополисахаридный комплекс), и они легко обесцвечиваются спиртом. Такие клетки затем окрашиваются дополнительно другой краской – фуксином Пфейффера – в красный цвет.

Наиболее четкие результаты окраска по Граму дает на молодых, суточных культурах бактерий. Имеются грамвариабельные микроорганизмы, отношение которых к окраске по Граму меняется на определенных этапах их жизненного цикла.

Окраска по Граму является примером *сложного* способа окрашивания, так как на мазок в определенной последовательности наносят уже не один, а несколько красителей в сочетании с химическими реактивами.

Ход окраски по Граму

1. Генцианвиолет (карболовый раствор) – 2 мин.
2. Раствор Люголя – 2 мин.
3. Спирт 96% - 20 – 30 сек.
4. Промыть водой.
5. Фуксин Пфейффера – 1 - 2 мин.
6. Промыть водой.
7. Высушить мазок фильтровальной бумагой.

Для сравнения (контроля) обычно одновременно с изучаемым объектом красят смесь клеток микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму известно.

Для диагностики важно иметь представление о размерах клеток вида. Определение размеров клеток микроорганизмов выполняют в три этапа: определение размеров клеток в делениях окулярной линейки, определение цены деления окулярной линейки в мкм, расчет размеров клеток в мкм.

Окулярный микрометр представляет собой стеклянную круглую пластинку, в центре которой выгравирована шкала с делениями (50 или 100). Окуляр-микрометр помещают в окуляр делениями вниз, предварительно отвинтив глазную линзу.

Цену деления окуляр-микрометра при данном увеличении микроскопа определяют с помощью специального приспособления – объект-микрометра, который представляет собой стеклянную пластинку с линейкой в центре. Эта линейка имеет длину 1 мм и разделена на 100 делений, каждое из которых равно 0,01 мм (10 мкм). Объект-микрометр помещают на предметный столик и фокусируют с тем объективом, при котором будут определять размеры клеток. Вращая окуляр и перемещая объект-микрометр, совмещают нулевую черту

окуляр-микрометра с любой чертой объекта-микрометра, после чего находят следующее совмещение. Операцию повторяют трижды. При этом находят, скольким делениям объекта-микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра. Допустим, два деления объекта-микрометра (20 мкм) соответствуют пяти делениям окуляра-микрометра, следовательно, цена деления окуляра-микрометра равна 4 мкм (20:5). Зная величину деления окуляра-микрометра, можно установить величину клеток микроорганизмов. С этой целью измеряют (при том же увеличении микроскопа), какому числу делений окуляра-микрометра соответствует длина и ширина клетки, и умножают полученные числа на цену деления окуляра-микрометра.

Самостоятельная работа

1. Изучение чистоты культуры бактерий неизвестного вида на скошенном агаре (МПА) по культуральным свойствам, морфологии в препарате, окрашенном по Граму и подвижности.
2. Определение размеров бактериальных клеток.
3. Ознакомление с особенностями роста бактерий на дифференциально-диагностических средах и приемами идентификации чистой культуры бактерий.
4. Ознакомление с определителями бактерий.
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Изучение чистоты культуры бактерий неизвестного вида на скошенном МПА в пробирках.

Культуральные свойства исследуют невооруженным глазом - просматривают рост культуры на скошенном агаре. Однородный слой бактерий на поверхности среды свидетельствует о ее чистоте, т.е. о содержании бактерий одного вида.

Морфологические свойства изучают в мазке, окрашенном по Граму. С этой целью отбирают бактериологической петлей часть культуры и готовят на предметном стекле (слева) мазок, а справа на этом же стекле готовят мазок контрольных микроорганизмов (смесь кишечной палочки и бациллы).

Мазки должны быть тонкими, чтобы клетки равномерно были распределены по поверхности стекла и не образовывали скоплений, так как толстый мазок может исказить результаты окрашивания. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки.

Окраску мазка по Граму выполняют в модификации Синева. На мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги, заранее пропитанной раствором генцианвиолета. Сухую фильтровальную бумагу увлажняют из капельницы водой так, чтобы из нее обильно выступила краска. Бумагу держат на препарате 2 мин. Затем бумагу снимают, излишки красителя стряхивают в чашку и, не промывая водой, мазок обрабатывают раствором Люголя (йод и калий йодистый в дистиллированной воде) до легкого почернения мазка.

Раствор Люголя стряхивают в чашку и обрабатывают препарат 96%-м этиловым спиртом. Это чрезвычайно ответственная операция, так как при дли-

тельной обработке мазка спиртом (свыше 30 сек) обесцвечиваются не только грамотрицательные, но и грамположительные микроорганизмы. При выполнении этой операции следует иметь под рукой часы с секундной стрелкой и колбу-промывалку с водой, чтобы быстро удалить спирт с мазка. Практика показывает, что для получения надежных результатов лучше всего спирт выдерживать на мазке не более 15 – 20 сек.

После промывки препарата водой его окрашивают в течение 1 мин водным фуксином.

Если окраска выполнена правильно, то кишечная палочка в контрольном мазке окрашивается в красный цвет (т.к. она грамотрицательная). Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет.

При микроскопии мазка с исследуемой культурой отмечают окраску бактерий (грам+ или грам-). Однородная культура в десяти просмотренных полях зрения свидетельствует о чистоте выделенных бактерий.

Для исследования подвижности бактерий подготавливают препарат «висячая капля» из культуры, выросшей на скошенном агаре, и просматривают под микроскопом при увеличении объектива 40^{\times} . Отмечают наличие или отсутствие подвижности. Подвижные клетки интенсивно передвигаются в поле зрения микроскопа в разных направлениях.

Работа 2. Определение размеров бактерий.

Измерения выполняют на фиксированном окрашенном препарате (можно и на препарате «висячая капля», но при легком нагревании, чтобы исключить движение жгутиковых форм). Измеряют не менее 10 клеток в разных полях зрения микроскопа. У кокков определяют диаметр, у других форм – длину и ширину.

Работа 3. Ознакомление с особенностями роста бактерий на дифференциально-диагностических средах.

Отмечают следующие свойства выросшей на среде культуры: в столбике желатина – наличие или отсутствие у бактерий протеолитического фермента и характер разжижения; на среде Гиса – наличие или отсутствие сахаролитической активности (о расщеплении углеводов свидетельствует появление газа и покраснение среды). Просматривая посев в столбике агара, отмечают отношение культуры к кислороду: рост по уколу (факультативные анаэробы) или на поверхности (аэробы).

Работа 4. Ознакомление с определителями бактерий.

Рекомендуется знакомство студентов с «Определителем бактерий Берджи» (9-е изд. В 2 т. – М.: Мир, 1997) и «Определителем бактерий и актиномицетов» (Н.А. Красильников, 1949).

В протокол исследования следует внести результаты выполненных исследований, зарисовать микроскопическую картину окрашенного по Граму препарата и записать ход окраски по Граму.

Контрольные вопросы

1. Как выполняют идентификацию чистой культуры?
2. Опишите методику измерения микробной клетки.
3. Для чего применяют окраску по Граму? В чем сущность метода Грама?

4. На каких дифференциально-диагностических средах изучают протеолитические и сахаролитические свойства бактерий?
5. По каким определителям выполняется идентификация бактерий, как они построены?

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 44 – 49.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 11 – 12, 29, 53 - 62.

Занятие 9. Экофизиология бактерий. Влияние факторов среды на микроорганизмы

Цель занятия. Исследование влияния ведущих экологических факторов на развитие микроорганизмов.

План занятия. 1. Изучение особенностей действия на клетки микроорганизмов физических факторов среды.

2. Изучение особенностей действия на микроорганизмы химических факторов внешней среды.

3. Самостоятельная работа: исследование отношения бактерий и грибов к температуре, кислотности среды, осмотическому давлению, аэрации, антибиотикам, солнечному свету; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Микроскопы. Демонстрационные чашки Петри с МПА (8 шт.). Демонстрационные чашки Петри с сусло-агаром (4 шт.). Демонстрационные пробирки с солодовым суслон (4 шт.). Демонстрационные пробирки с МПБ (4 шт.). Пробирки с разводкой пекарских дрожжей в дистиллированной воде (6 шт.). Мелкокристаллическая поваренная соль. Демонстрационные чашки Петри с МПА и дисками антибиотиков (6 шт.). Демонстрационные чашки Петри с СА и фитонцидами (биомасса лука или чеснока). Демонстрационные посеы бактерий на МПА после воздействия солнечных лучей (3 чашки). Линейки с миллиметровыми делениями. Стекла предметные. Кольца Ван-Тигема. Фуксин в капельницах. Масло иммерсионное. Бактериологические петли. Колбы-промывалки. Тетради для высушивания мазков. Таблица: методы изучения антибиотиков.

Пояснения к занятию

Жизнедеятельность микроорганизмов, их численность и уровень биологического разнообразия микробных ценозов всецело определяются условиями окружающей среды: температурой, активной кислотностью, аэрацией, наличием и доступностью питательных веществ и т.д.

Нормальное развитие микроорганизмов осуществляется при действии каждого из факторов лишь в определенных пределах. Изменение этих пределов ведет к изменению численности и жизнеспособности микроорганизмов, к смене доминирующих видов в микробном сообществе (т.е. сукцессиям), а в отдельных случаях и к смене микробного сообщества. Поэтому изучение экологии микроорганизмов тесно связано с изучением активности ведущих

экологических факторов. Знание механизма действия этих факторов на микробную клетку позволит определить, в какой степени сдвиг в ту или иную сторону отразится на жизнеспособности микроорганизмов.

Влияние фактора окружающей среды изучают путем выращивания микроорганизмов при воздействии или после воздействия исследуемого фактора; результат влияния определяют по интенсивности роста микроорганизмов в питательных средах.

Следует подчеркнуть, что результат внешних воздействий на микробную клетку зависит от механизма и длительности действия фактора, видовой пластичности микроорганизмов, интенсивности воздействия, а также от физических и химических условий среды.

В микробиологической практике интенсивность роста микроорганизмов часто выражают ориентировочными визуальными показателями: на жидких средах – степенью помутнения, на агаризованных – плотностью роста культуры. Для более точной оценки используются количественные методы: подсчет числа клеток в единице объема среды, определение общей биомассы культуры в единице объема среды и др.

Лабораторная работа по изучению влияния факторов внешней среды на микроорганизмы выполняется в рамках одного занятия. Все подготовительные работы и демонстрационные посева до начала занятия выполняет лаборант под контролем преподавателя. При наличии возможности лучше проводить работу на двух занятиях: на первом занятии проводится посев микроорганизмов и выращивание после или при воздействии исследуемого фактора внешней среды, а на втором занятии анализируется результат.

Температура среды. От температуры окружающей среды зависит не только интенсивность развития микроорганизма, но и сама возможность его существования. Жизнедеятельность каждого организма имеет определенные температурные границы. Температура в зависимости от значения и продолжительности воздействия может регулировать рост, изменять морфологию и метаболизм, вызывать гибель бактерий. Эту зависимость выражают тремя кардинальными точками: минимум – температура, при незначительном снижении которой рост микроорганизмов приостанавливается; оптимум - температура, при которой скорость роста микроорганизмов максимальная; максимум – температура, при незначительном повышении которой рост микроорганизмов прекращается. Большинство микроорганизмов плохо переносят превышение максимальной температуры развития. Уже при 56⁰С возможна тепловая коагуляция белка, при которой клетка погибает. Термоустойчивость микроорганизмов различна в зависимости от видовых особенностей и формы жизнедеятельности: вегетативные клетки погибают быстрее, споровые сохраняются дольше.

Самостоятельная работа

1. Изучение результатов воздействия высокой температуры на бесспорные и споровые бактерии.

2. Изучение результатов воздействия высокой температуры на развитие мицелиального гриба.

3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Определение термоустойчивости бесспорных и спорных бактерий.

При подготовке к этой работе водяную баню нагревают до температуры 80⁰С. Чашки Петри с застывшим МПА расчерчивают со стороны дна на три сектора, которые обозначают по времени прогревания культуры (0 – 10 – 30). Делают посев заготовленной заранее взвеси бесспорных и спорных бактерий (в физиологическом растворе) бактериологической петлей на сектор 0, т.е. без прогрева. Посев производится методом штриха на поверхности агара. Пробирку с культурой помещают в водяную баню и прогревают 10 мин, после чего производят посев культуры на сектор 10. Вновь помещают пробирку в водяную баню, прогревают дополнительно 20 мин и высевают культуру на сектор агара 30. Чашки инкубируют в термостате при температуре 37⁰С.

Для определения термоустойчивости бесспорных и спорных бактерий студенты просматривают секторы чашек, выявляют отсутствие или наличие роста; определяют интенсивность роста ориентировочным визуальным методом по плотности и по площади слоя, при этом пользуются следующими обозначениями: - (отсутствие роста), + (слабый рост), ++ (умеренный рост), +++ (обильный рост). Для контроля однородности культуры приготавливают препараты, окрашенные фуксином, из культуры всех секторов (несколько мазков на одном предметном стекле), микроскопируют и делают зарисовки.

Результаты опыта заносят в протокол исследования по форме:

| Название культуры | Рост после нагрева до 80 ⁰ С в течение, мин | | | Заключение по опыту |
|-------------------|--|----|----|---------------------|
| | 0 | 10 | 30 | |
| | | | | |

Работа 2. Изучение результатов воздействия высокой температуры на развитие мицелиального гриба.

Заранее заготовленные чашки Петри с сусло-агаром надписывают со стороны дна – 5, 25, 40 (обозначения соответствуют температуре выращивания гриба) и переворачивают чашки крышкой вверх. Берут пробирку с водной суспензией спор мицелиального гриба (удобно для постановки опыта взять культуру аспергилла) и наносят бактериологической петлей каплю суспензии на поверхность сусло-агара в центре пластинки. Засеянные чашки помещают вверх дном для выращивания культуры при соответствующих температурах (5, 25 и 40⁰С).

Влияние температуры на развитие гриба исследуется по следующим показателям: величина диаметра колоний (измеряется миллиметровой линейкой со стороны дна чашки) и наличие спороношения (величина окрашенной зоны колонии). Результаты опыта записывают по форме:

| Температура выращивания гриба, °С | Показатели интенсивности развития гриба | |
|-----------------------------------|---|-----------------------|
| | диаметр колонии, мм | зона спороношения, мм |
| | | |

Кислотность среды. Реакция среды определяется активной концентрацией водородных и гидроксильных ионов, образующихся при электролитической диссоциации ряда соединений в водном растворе, и выражается величиной рН.

Различные микроорганизмы имеют свою зону рН, в пределах которой они могут развиваться. Плесневые грибы, дрожжи, бактерии рода *Acetobacter* лучше растут при кислой реакции среды (рН 3 - 5). Такие микроорганизмы называют ацидофильными. Аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, а также актиномицеты хорошо растут в нейтральной и слабощелочной среде. Очень чувствительны к реакции среды азотофиксирующие бактерии.

Реакция среды оказывает влияние на жизнедеятельность клеток, на образование и активность ферментов. От концентрации водородных ионов зависит поступление питательных веществ в клетку. Ионы водорода могут взаимодействовать с транслоказами, вызывая их инактивацию и нарушая тем самым транспорт питательных веществ в клетку. В кислой среде усиливается отрицательное действие других факторов.

Самостоятельная работа

1. Изучение результата влияния кислотности среды на культуру дрожжей и гнилостные (аммонифицирующие) бактерии.
2. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Рост культуры дрожжей и гнилостных бактерий.

Заранее подготавливают ряд из четырех пробирок с одинаковым объемом стерильного солодового суслу с рН 3, 5, 7, 9. В каждую пробирку вносят пипеткой одинаковое количество дрожжевой суспензии. Пробирки помещают в термостат для выращивания при 30⁰С. Параллельно подготавливают ряд пробирок, содержащих стерильный МПБ с такими же значениями рН. В каждую пробирку с соблюдением правил стерильности вносят бактериологической петлей взвесь гнилостных бактерий (протей или картофельная палочка). Пробирки помещают в термостат при температуре 37⁰С.

Студенты просматривают пробирки с посевами и встряхивают содержимое для равномерного распределения выросшей культуры. Интенсивность роста оценивают по степени мутности среды и обозначают условно (количеством крестов). Для контроля опыта готовят фиксированные, окрашенные фуксином препараты из содержимого пробирок, в которых отмечен рост культуры; микроскопируют и зарисовывают. Результаты опыта записывают по форме:

| Название культуры | Интенсивность развития бактерий при значениях рН среды | | | |
|-------------------|--|---|---|---|
| | 3 | 5 | 7 | 9 |
| | | | | |

Примечание: интенсивность роста микроорганизмов в жидкой среде отмечают крестами: интенсивное помутнение среды +++; незначительное ++; еле заметное +; прозрачная среда - .

Осмотическое давление. В условиях высокой концентрации растворенных в среде солей или сахаров и при высоком осмотическом давлении могут развиваться далеко не всякие микроорганизмы. По отношению к солености среды выделяют несколько групп микроорганизмов: негаллофильные организмы (обитатели пресных и ультрапресных вод), галотолерантные (выдерживающие концентрацию NaCl 3%), морские микроорганизмы (оптимум солености около 3,5%), умеренные галофилы (диапазон солености от 5 до 15%), экстремальные галлофилы (от 15% вплоть до насыщения растворов). В отдельную группу выделяют осмофильные микроорганизмы, обитающие в медах, варенье, сиропах, нектаре цветов (некоторые мицелиальные грибы и дрожжи).

При высоком осмотическом давлении у большинства микроорганизмов наступает плазмолиз клетки – протоплазма выделяет воду и уплотняется; при этом затормаживаются процессы обмена веществ и клетка переходит в состояние анабиоза.

Самостоятельная работа

1. Изучение явления плазмолиза в клетках дрожжей в концентрированном растворе NaCl.
2. Определение влияния концентрации глюкозы на развитие мицелиального гриба.
3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Плазмолиз в дрожжевых клетках.

Пекарские дрожжи разводят в дистиллированной воде до незначительной мутности суспензии. Каплю суспензии помещают на предметное стекло и вносят в нее несколько кристалликов поваренной соли. Через несколько минут проводят микроскопию при увеличении 900 раз. В плазмолизированных клетках протоплазма отделяется от оболочки и сморщивается. Микроскопическую картину следует зарисовать в альбоме.

Работа 2. Влияние концентрации глюкозы на мицелиальные грибы.

Заранее производят посев мицелиального гриба в пивное сусло с 20, 40 и 60%-й концентрацией глюкозы и без нее (контроль). Посевы помещают в термостат при температуре 25 – 35⁰С. Интенсивность роста плесневого гриба устанавливают по развитию грибницы и спорообразованию (окраске грибницы). Для контроля культуры готовят из грибницы препарат «раздавленная капля», микроскопируют с объективом 40^X и зарисовывают.

Аэрация среды. По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на четыре группы: облигатные аэробы (плесневые грибы, нитрификаторы), микроаэрофилы, факультативные анаэробы (кишечная палочка, лактобактерии) и облигатные анаэробы (представители рода *Clostridium*). Чтобы судить о принадлежности микроорганизма к той или иной группе, микробную суспензию высевают в пробирки с расплавленной и остуженной агаризованной питательной средой. Посев можно проводить уколом. Строгие аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое. Микроаэрофилы – на некотором расстоянии от поверхности. Факультативные анаэробы развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

Самостоятельная работа

1. Изучение влияния аэрации на рост культуры дрожжей.
2. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Рост дрожжей в условиях различной аэрации среды.

Подготавливается суспензия дрожжей в стерильной водопроводной воде, которой засевают среду в 2 колбах и 2 высоких пробирках (во все сосуды по 2 – 3 капли суспензии). Колбы и пробирки через сутки вынимают из термостата и помещают в холодильник.

Студенты сравнивают развитие дрожжей в разных условиях аэрации. При наличии времени интенсивность роста можно определить подсчетом клеток в камере Горяева. В протоколе исследования делают соответствующие выводы.

Антибиотики. Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности вырабатывают биологически активные вещества, которые губительны для других микробов. Эти вещества получили название антибиотиков. От других антимикробных веществ они отличаются избирательностью действия и способностью подавлять жизнедеятельность определенных видов микроорганизмов в ничтожно малых концентрациях.

Антибиотики различны по химической природе и антимикробному действию. Одни из них лишь угнетают развитие микроорганизмов (бактериостатическое действие), другие убивают их (бактерицидное действие). Известны также антибиотические вещества, вырабатываемые высшими растениями (фитонциды) и животными организмами (лизозим и др.). Биологическая активность антибиотиков устанавливается в Е. Д. За единицу активности принимают минимальное количество вещества, которое способно задержать рост микроба.

Существуют различные методы определения антагонизма микробов: метод диффузии в агар, колориметрический метод, метод разведения и т.д.

Самостоятельная работа

1. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам по величине зоны задержки роста на МПА с дисками (метод диффузии).

2. Определение фитонцидного действия чеснока на живые организмы – простейшие (Protozoa).
3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Активность антибиотиков.

Соблюдая правила стерильности, наносят пипеткой на поверхность МПА в чашке Петри каплю взвеси бактерий (микрোকки, сарцины), тщательно растирают ее по всей поверхности среды при помощи стерильного шпателя. Обожженным пинцетом наносят на поверхность агара диски, пропитанные антибиотиком (желательно несколько дисков с разными антибиотиками). Диски располагают по окружности чашки. Чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 37⁰С.

Студенты рассматривают чашки с посевами бактерий, измеряют с помощью линейки зону задержки роста вокруг каждого диска. Зона диаметром до 15 мм свидетельствует о малой чувствительности микроба к данному антибиотику, диаметром свыше 25 мм – высокой чувствительности. Отсутствие зоны задержки роста говорит о том, что микроорганизм резистентен к данному антибиотику. Результаты записывают по форме:

| Название бактерий | Величина (мм) зоны задержки роста при действии | | | | Заключение о степени чувствительности |
|-------------------|--|-----------|--------------|-------------|---------------------------------------|
| | пенициллина | биомицина | левомицетина | ристомицина | |
| | | | | | |

Работа 2. Фитонцидное действие чеснока.

На предметном стекле с помощью парафина укрепляют 2 – 3 кольца Ван-Тигема. В образовавшуюся камеру вносят по 0,5 мл вытяжки, приготовленной из мезги свежепротертого чеснока в разных разведениях (1:1, 1:10, 1:20). Разведения делают в расчете на единицу массы растираемой ткани или объема сока из мезги. Сверху колец с помощью вазелина укрепляют покровные стекла с висячей каплей суспензии инфузорий в центре. Предметное стекло с кольцами помещается на столик микроскопа и рассматривается при малом увеличении. Отмечают, через какой период времени наступает паралич инфузорий. Результаты заносят в протокол исследования.

Солнечный свет. Солнечный свет обладает большим потенциалом вредного воздействия на микроорганизмы. Способностью использовать энергию видимого света обладают лишь фототрофные организмы. Микроорганизмы, не имеющие пигментов, погибают под действием прямых солнечных лучей. Под влиянием лучистой энергии солнца происходят внутриклеточные реакции с образованием гидроксильных радикалов и других высокореактивных веществ, повреждающих микробную клетку.

Самостоятельная работа

1. Изучение действия солнечных лучей на клетки бактерий.
2. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Действие солнечной радиации на микроорганизмы.

На поверхность МПА в чашке Петри высевают каплю взвеси бактерий (кишечная палочка), тщательно растирают ее по всей поверхности среды при помощи стерильного шпателя. Крышку чашки удаляют, а сверху на газон кишечной палочки накладывают непрозрачную пластинку, в которой прорезают отверстие в форме круга, звезды, квадрата и т.п., и выставляют на солнце.

На занятии студенты рассматривают чашки с посевами бактерий и убеждаются, что в тех местах, где подействовал свет, бактерии роста не дают. Результат наблюдений заносят в протокол исследования.

Контрольные вопросы

1. Как влияют факторы внешней среды (температура, рН, осмотическое давление, аэрация, свет, антибиотики) на клетки микроорганизмов?
2. Какими методами определяют интенсивность роста микробов при изучении влияния факторов внешней среды на микроорганизмы?
3. Опишите лабораторный способ определения антимикробной активности: высоких температур; кислотности среды; осмотического давления; антибиотиков и фитонцидов.

Список литературы

Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 86 – 88, 111 - 112.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБОЦЕНОЗОВ

Изучение функционирования микробоценозов непосредственно в природных средах – одна из сложнейших и, вместе с тем, важнейших задач экологической микробиологии. Еще основоположник экологического направления в микробиологии С.Н. Виноградский постоянно подчеркивал необходимость исследования микроорганизмов в естественной среде обитания.

В естественных условиях микроорганизмы развиваются на средах иного состава, чем лабораторные и, что весьма важно, не изолированно, а в определенном, иногда очень сложном биотическом окружении. Поэтому успехи экологии микроорганизмов тесно связаны с методами, которые позволяют измерять и наблюдать микроорганизмы в их природных экологических нишах.

В последние годы появились новые методы, позволяющие изучать состав и динамику микробных сообществ. Для наблюдения за микроорганизмами в природных образцах (в том числе за некультивируемыми формами) и изучения

процессов, происходящих в природе с участием микроорганизмов, стали применять молекулярно-биологические методы, микроэлектродную технику, радиоизотопы, люминесцентно-микроскопические и флуоресцентные методы исследования. Применение ингибиторного анализа при работе с природными субстратами во многих случаях позволило определить активность отдельных физиологических групп микроорганизмов и оценить их вклад в образование первичной продукции.

На занятиях, вошедших в данный раздел, студенты знакомятся с классическими методами экологии микроорганизмов, не требующими сложного аппаратного оформления, дорогостоящих химических реактивов, но до сих пор не потерявшими своего значения.

Занятие 10. Экологические методы изучения почвенных микробоценозов на основе стеклотехники

Цель занятия. Ознакомление с методами изучения микробных ассоциаций и взаимоотношений между разными группами организмов непосредственно в почве.

План занятия. 1. Изучение микробных ценозов почвы методом обрастания стекол по Холодному.

2. Изучение микробных пейзажей почвы капиллярным методом Перфильева и в модификации по Аристовской.

3. Самостоятельная работа: исследование микроскопической картины на стеклах обрастания и в капиллярах педоскопа; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Микроскопы. Вегетационные сосуды со стеклами обрастания в почве. Капиллярные педоскопы. Стаканы с водой. Карболовый эритрозин в стаканчиках. Масло иммерсионное. Демонстрационные планшеты фотографий стекол обрастания. Фотонасадка к микроскопу.

Пояснения к занятию

Мир почвенных микроорганизмов очень многообразен. В почве обитают бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и простейшие. Преобладающими микроорганизмами являются различные группы бактерий и бацилл, второе место по численности занимают актиномицеты; численность грибов сравнительно не высокая, хотя биомасса их благодаря ветвлению мицелия может быть очень значительной. В почвенных образцах из таежно-лесной зоны грибы занимают доминирующее положение. Большое влияние на общую численность и на соотношение отдельных систематических групп микроорганизмов оказывает тип и состояние почвы. Наибольшее количество бацилл и актиномицетов содержится в черноземах и сероземах. Дерново-подзолистые почвы характеризуются более низким содержанием микроорганизмов. Положительное влияние на развитие почвенных микроорганизмов оказывает окультуривание почв. В окультуренных почвах численность микроорганизмов значительно выше, чем в целинных (в 2 – 10 раз).

Микробное население почвы подразделяют на прикрепленные и «ползающие», т.е. свободные виды. Последние благодаря постоянному перемещению обуславливают пестроту, разнообразие качественного состава микробиоценоза. Однако большинство микроорганизмов адсорбируется на почвенных частицах и их агрегатах, образуя микроколонии.

Заселенность почвенных частиц, как правило, неравномерная, микроочаговая. Это свидетельствует о разнокачественности их и способности микроорганизмов изменять среду обитания, что в итоге приводит к формированию множества микросред с самыми разнообразными условиями.

Мицелиальные формы – грибы и актиномицеты – формируют крупные скопления за счет ветвления мицелия. В их ассоциациях часто поселяются бактерии, питающиеся продуктами метаболизма или отмершим мицелием. Значительный интерес представляют многоклеточные образования (агрегаты) почкующихся бактерий, состоящие из материнской клетки и нескольких дочерних. Молодые дочерние клетки подвижны. Они периодически покидают материнскую колонию и сами формируют новые микроколонии. Такие колонии заселяют почвенные гранулы размером до 0,5 мм. Совокупность заселенных гранул, включающих систему пор и капилляров, заполненных газовой смесью и почвенным раствором, образует сложный микроочаг размером до 5 мм. Он может рассматриваться как простейшая микробная экосистема, которая обязательно должна включать автотрофный компонент. Им могут быть водоросли, цианобактерии, корни живых растений. В таких микроэкосистемах не обязательно присутствие всех физиологических групп микроорганизмов. И даже из имеющихся не все должны быть активными.

Микробные сообщества в целом могут противостоять изменениям среды и сохранять состояние равновесия (гомеостаз). Для микробиоценозов, находящихся в стадии гомеостаза, характерна максимальная продуктивность и максимальное количество симбиотических связей между организмами. Равновесные ценозы содержат наиболее разнообразную микрофлору, здесь между членами сообщества складываются разные типы взаимоотношений – от симбиоза и мутуализма до паразитизма и хищничества.

В сохранении стабильности структуры и функционирования микробиоценозов существенную роль играют члены биоценоза. В процессе жизнедеятельности они могут перестраивать, изменять и регулировать в определенных границах физико-химические условия среды. Нередко такие изменения оказываются неблагоприятными для развития и жизни сообщества. В недрах его начинает складываться другое сообщество, способное ассимилировать новые условия. Такой процесс называют сукцессией. Типичным примером сукцессии микробиоценозов в почве служит последовательная смена аммонификаторов на разлагающихся органических остатках. Минерализация органического вещества осуществляется гетеротрофными микроорганизмами поэтапно, причем для каждого этапа характерна своя доминирующая микрофлора. Поэтому процесс разложения сопровождается последовательной сменой одного микробного сообщества другим.

Изучение структуры микробных сообществ почвы, их саморегуляции и основных механизмов самоподдержания стабильности очень важно как в теоретическом, так и в прикладном отношении. Это обусловлено тем, что почвенная микрофлора определяет «здоровье» почвы, способность почвенной биосистемы поддерживать продуктивность растений и животных, сохранять приемлемое качество воды и воздуха, обеспечивать условия развития и процветания жизни.

Для изучения микробных ценозов почвы Н.Г. Холодный (1930) разработал метод стекол обрастания, принцип которого состоит в том, что в почву закладываются стерильные предметные стекла и выдерживаются там до месяца. За это время поверхность стекол обрастает микрофлорой, характерной для исследуемой почвы. Микроскопический анализ стекол обрастания может дать представление о составе и взаимоотношениях микроорганизмов в почве, а также об относительном богатстве почвы микроорганизмами. Метод Холодного имеет ряд ограничений. Во-первых, стекло не является абсолютно инертным в химическом отношении субстратом и поэтому в его зоне создается физико-химический режим, отличающийся от режима окружающей почвы, в частности, изменяются условия влажности, что влияет на состав формирующихся микробных ассоциаций. Во-вторых, при извлечении стекла из почвы может быть нарушен естественный вид микробного пейзажа. В-третьих, происходит быстрое высыхание поверхности стекла и микроскопирование объектов в живом состоянии практически невозможно.

В связи с этим был предложен ряд модификаций метода Холодного. Сущность их сводилась к тому, что стекла перед закладкой в почву покрывались определенной агаризованной питательной средой (крахмалоаммиачный или голодный агар). Однако наличие среды на стекле создает селективные условия для ограниченной группы микроорганизмов, и образующиеся обрастания не отражают истинную природу почвенных микробценозов.

Дальнейшее развитие методов стеклотехники стало возможным благодаря работам Б.В. Перфильева и Д.Р. Габе (1961), которые для изучения микробных пейзажей в поверхностном слое ила сконструировали прибор пелоскоп, впоследствии переименованный в педоскоп. Педоскоп предназначен для изучения микробных пейзажей почвы и наблюдений за живыми микроорганизмами. Капиллярный педоскоп представляет собой набор 5-ходовых капиллярных ячеек, которые по 5 – 7 штук вставляются в стеклянный держатель. Каналы капилляров имеют ширину около 1 мм и высоту 0,2 – 0,3 мм. В них и происходит развитие микробов (рис. 21). Проточность почвенного раствора и воздуха через капилляры, а также наличие твердых стенок стекла создают в педоскопах при помещении их в почву условия для микроорганизмов, максимально приближающиеся к естественным.

Метод капиллярных педоскопов имеет ряд преимуществ перед методом стекол обрастания. Микробные обрастания в педоскопах образуются на внутренней стороне стенок капилляров, в связи с чем при извлечении прибора из почвы они не нарушаются. Высыхание почвенного раствора в капиллярах происходит медленно, что дает возможность микроскопировать пейзажи в живом

виде, а по мере необходимости даже производить высев содержимого капилляров на питательные среды для выделения чистых культур микроорганизмов.

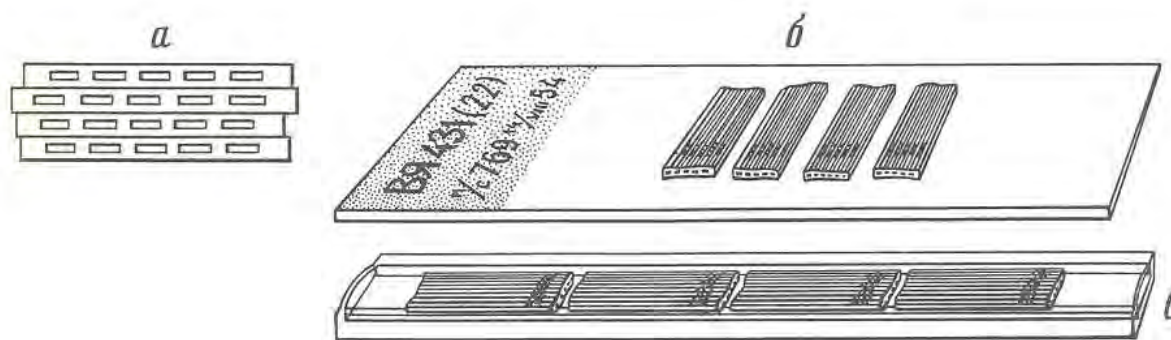


Рис. 21. Капиллярный педоскоп Перфильева для изучения микробных пейзажей почвы и донных отложений (по С.И. Кузнецову, Г.А. Дубининой):
а – блок капилляров прямоугольного сечения; б – крепление на предметном стекле; в – крепление в стеклянном пенале

Т.В. Аристовская предложила перед помещением капилляров в почву покрывать их стенки питательной средой, содержащей почвенную вытяжку или определенную фракцию гуминовых веществ. Это приближает условия развития микроорганизмов внутри капилляров к естественным. В качестве питательных сред обычно используют органо-минеральные комплексы гумусовых веществ, извлеченных из изучаемого типа почвы.

Самостоятельная работа

1. Исследование микробных пейзажей на стеклах обрастания.
2. Изучение микробных ценозов в капиллярах педоскопа.
3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Микробные пейзажи на стеклах обрастания.

Чистые обезжиренные стерильные предметные стекла закладывают в почву; для этого в почве ножом делают небольшой разрез, куда вертикально вставляют стекло, плотно прижимают его к стенке разреза и засыпают почвой, сверху ставят метку. В пахотном слое стекла помещают на 3 – 5 см ниже поверхности почвы. Срок экспозиции стекол в почве около месяца. По истечении его стекла откапывают (но не вытаскивают!), осторожно освобождают от почвы (с тыльной стороны стекла почву убирают, вытирая сухой тряпкой), помечают исследуемую сторону, подсушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки (для большей прочности связи микроорганизмов со стеклом). Затем стекла осторожно отмывают водой от почвенных частиц, помещая каждое из них наклонно в стакан с водой верхней стороной вниз (на 15 мин). После промывки препараты окрашивают 3%-м раствором эритрозина на 5%-й карболовой кислоте в течение 30 мин, промывают водой и микроскопируют с иммерсией. При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания и доминирующие формы.

Модификация метода Холодного заключается в том, что стекла перед помещением в почву покрывают тонким слоем агаризованной питательной среды (крахмало-аммиачным агаром). Микроорганизмы развиваются быстрее и лучше, но внесенное на стекло органическое вещество создает специфические условия для развития микроорганизмов. Хорошие результаты получают при изучении стекол обрастания при помощи люминесцентной микроскопии. Стекла окрашивают водным раствором акридина оранжевого (1:10000). Клетки микроорганизмов при этом видны более четко, кроме того, можно наблюдать клетки, расположенные на поверхности почвенных частиц, прилипших к стеклу.

При изучении почвы в лабораторных условиях ее помещают в вегетационные сосуды, увлажняют и уплотняют. Влажность в течение всего опыта поддерживают на одинаковом уровне. В таких условиях время экспозиции стекол может быть сокращено до 10 дней.

Работа 2. Капиллярный метод Перфильева (педоскопы).

Для работы используют педоскопы, простерилизованные сухим жаром. Стерильные педоскопы вставляют в почву так, чтобы каналы капилляров были расположены вертикально, т.е. служили как бы продолжением капилляров почвы и соответствовали направлению движения почвенного раствора. В рыхлую почву педоскопы вставляют без каких-либо дополнительных приспособлений под небольшим нажимом, в уплотненную почву – при помощи специального пробойника. Экспозиция педоскопов в почве один месяц (в лабораторных условиях 15 дней). По истечении данного срока педоскопы извлекают, очищают от почвенных частиц, отдельные капиллярные ячейки помещают на тонкое предметное стекло и рассматривают (микроскопировать лучше в фазовом контрасте). При просмотре содержимого капилляров в живом состоянии педоскопы желательно помещать на специальный столик, предохраняющий каналы капилляров от высыхания. Можно ходы каналов замазать парафином или пластилином. Для изучения морфологии бактерий педоскопы фиксируют в парах 40%-го формалина (15 мин) или над пламенем горелки и окрашивают 3%-м карболовым эритрозинном. После окраски капилляры промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Обязательным условием является заполнение капилляров иммерсионным маслом.

Модификация капиллярного метода по Аристовской заключается в том, что стенки капилляров перед закладкой педоскопов в почву покрывают фракциями гуминовых веществ. Для получения органо-минеральных комплексов 50 г почвы заливают 1 л 0,1 н. NaOH, а через 18 – 20 ч почву отфильтровывают и, добавляя 0,2 н. HCl, доводят pH фильтрата до 5,0. После этого в него по каплям прибавляют 20%-й раствор FeCl₃ до полного выпадения гумусовых веществ в форме органо-минерального геля. Полученный гель отфильтровывают и отмывают от солей (проба на Cl⁻ с 1%-м AgNO₃). Примерно 5 мл геля растирают в ступке, взбалтывают в 1 л воды, добавляют 0,1%-й раствор агара и стерилизуют.

Гумусовые вещества с 0,1%-ным раствором агара выливают в стерильную чашку Петри и педоскопы боковой стороной погружают в них. Среда должна заполнить все капилляры. Затем педоскопы вынимают, обтирают их поверхность и помещают в стерильные чашки Петри, где среда подсыхает и равномерно покрывает стенки капилляров. В каналах не должно образовываться

перемычек. Часть среды можно оттянуть из каналов при помощи стерильной фильтровальной бумаги. Подсушенные капилляры вставляют в почву.

В протоколе исследования зарисовывают микробные пейзажи на стеклах обрастания. Отдельные ассоциации микроорганизмов можно зафиксировать на фотопленке. Методика микрофотографирования описана в приложении к настоящему практикуму.

Контрольные вопросы

1. Какие особенности микробных ценозов почвы Вы знаете?
2. Какие методы применяют для изучения почвенной микрофлоры в естественной среде обитания?
3. Опишите метод обрастания стекол по Холодному, в каких целях он используется?
4. В чем особенности капиллярного метода Перфильева?

Список литературы

1. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. - С. 39 - 43.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 115 – 116.

Занятие 11. Методы оценки биологической активности почвы

Цель занятия. Ознакомление с методами изучения биологической активности почвы в лабораторно-полевых условиях.

План занятия. 1. Изучение методов оценки целлюлазной и суммарной протеолитической активности почвы.

2. Изучение биологической активности почвы по методу Мишустина, Вострова, Петровой.

3. Знакомство с методом определения интенсивности дыхания почвы.

4. Изучение биологической активности почвы по методу Аристовской и Чугуновой.

5. Самостоятельная работа: оценка биологической активности почвы аппликационными методами, по уровню выделения почвой углекислого газа и аммиака; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Vegetационные сосуды со стеклянными пластинами, обшитыми льняной тканью, и полосками фотобумаги. 0,5%-й раствор нингидрина в ацетоне, залитый в баллон пульверизатора. Сушильный шкаф. Весы (желательно аналитические). Малые эксикаторы. Бюксы с 0,1 н. раствором NaOH. Раствор BaCl₂. Раствор HCl (0,1 н.). Фенолфталеин. Чашки Петри с образцами почв. Стаканы с водой. Мочевина в стаканчиках. Полоски бумаги, пропитанные универсальным индикатором. Демонстрационные стекла с льняной тканью.

Пояснения к занятию

Биологическая активность почвы – это свойство почвы, отражающее интенсивность протекающих в ней биологических процессов. Выражается суммарным проявлением активности биохимических процессов, обусловленных аккумулярованными почвой ферментами микробного и растительного происхождения.

Биологическая активность почв характеризует размеры и направление процессов превращения веществ и энергии в экосистемах суши; интенсивность переработки органических остатков и разрушения минералов.

Показателями биологической активности почв могут служить количественные характеристики численности и биомассы почвенной биоты, их продуктивность, активность основных процессов, связанных с круговоротом важнейших элементов (С, N, О, Р, S и др.), ферментативная активность почв и др.

Методы определения биологической активности почв делят на две группы: 1) методы определения действительной, актуальной биологической активности почв (полевые методы определения дыхания, азотфиксации, денитрификации и др.); 2) методы определения потенциальной биологической активности почв, т.е. активности, которая обнаруживается в лаборатории при оптимальных условиях для протекания данного процесса (определение ферментативной активности почв, лабораторные методы определения интенсивности дыхания и т.д.).

Экологу важно знать, что показатели биологической активности почв могут быть использованы для ранней диагностики загрязнения почв промышленными выбросами и оценки уровня загрязнения (при возможности сравнения с соответствующими фоновыми почвами). В качестве таких показателей используются: скорость деструкционных процессов (активность распада целлюлозы), накопление аминокислот на ткани, дыхание почвы и некоторые другие.

Методы оценки целлюлазной и суммарной протеолитической активности почвы

Целлюлазная активность почвы является одним из суммарных показателей интенсивности почвенной биодинамики.

Принцип метода Вострова и Петровой базируется на учете скорости разложения льняной ткани в почве. Стеклопластины размером 10 X 50 см обтягивают отстиранной от крахмала льняной тканью, которую предварительно взвешивают на аналитических весах. Пластины вставляют в почвенный разрез так, чтобы ткань плотно прилегала к его стенкам. Разрез засыпают вынутой из него почвой. Через месяц пластины вынимают, очищают от почвы и обрабатывают последовательно 1%-й соляной кислотой, 1%-м раствором соды, дистиллированной водой и высушивают. После визуального анализа степени разложения ткань снимают с пластины, очищают от частиц почвы и взвешивают. Убыль в весе ткани характеризует целлюлозоразрушающую активность почвы, которую выражают в граммах убыли сухого веса ткани или в процентах от исходного веса.

Определение суммарной протеолитической активности почвы проводят по методу Мишустина, Никитина, Вострова с использованием фотоматериалов, покрытых слоем желатина. Метод позволяет проследить за интенсивностью разложения протеина и дать косвенную оценку содержания в почве доступного азота.

Полоски непроявленной фотопленки, фотобумаги или рентгеновской пленки, размером 5 X 20 см, взвешивают на аналитических весах, помещают

вертикально в разрез почвы, плотно прижимая почву к фотоматериалу. Через 7 – 10 дней материал осторожно извлекают из почвы, промывают, высушивают при комнатной температуре, затем снова взвешивают. По разности в весе до и после экспозиции в почве судят о протеолитической активности, которую выражают в миллиграммах разложившейся желатины (протеин) на 100 см² фотоматериала или в процентах от исходного веса.

Определение биологической активности почвы по методу Е. Н. Мишустина, И.П. Вострова, А. Н. Петровой

Накопление в почве свободных аминокислот происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Поэтому суммарное количество аминокислот может служить достоверным показателем интенсивности микробиологических процессов.

Метод основан на применении хроматографических проявителей для выявления аминокислот на льняном полотне после экспонирования его в почве. При постановке опыта обшивают льняным полотном хорошо вымытые стекла (10 x 50 см), стерильной лопаткой и стерильным ножом делают почвенный разрез на глубину 55 см. К ровной стенке по его профилю прикладывают стекло с полотном, с противоположной стороны стекло засыпают почвой и прижимают плотно к стенке. Полотно закладывают, отступая от поверхности почвы на 2 – 3 см. В том месте, где помещают полотно, ставят этикетку. После экспозиции в течение 20 – 30 дней стекло откапывают и вынимают, подсушивают полотно и осторожно стряхивают с него почвенные частицы. Для выявления аминокислот полотно опрыскивают 0,5%-м раствором нингидрина в ацетоне и высушивают при комнатной температуре в течение 24 часов. На полотне проявляются сиреневые пятна аминокислот.

Для выражения степени разложения полотна в процентах вырезают его выделенную площадь на глубину горизонта (анализ проводят по горизонтам), промывают частички полотна водой, высушивают и взвешивают. Такую же площадь вырезают с полотна, которое служило контролем. Затем определяют степень разложения полотна.

Определение интенсивности дыхания почвы

Суммарным показателем биологической активности почвы является выделение ею углекислоты, количественное определение которой производят в полевых и лабораторных условиях.

Определенную площадь почвы изолируют от окружающего воздуха сосудом, под который помещают чашку со щелочью для поглощения СО₂. Через определенный промежуток времени щелочь оттитровывают кислотой. Контролем служит щелочь, помещенная в такой же сосуд без почвы (сосуд и щелочь ставят не на почву, а на стеклянную подставку). По разности количества кислоты, пошедшей на титрование щелочи в контроле и опыте, вычисляют по формуле количество выделившейся углекислоты за единицу времени:

$$D = \frac{(a - b) \cdot 1,1 \cdot 100}{S \cdot t \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где D – интенсивность дыхания, кг/га/ч; a и b – количество 0,05 н. кислоты, пошедшее на титрование щелочи соответственно в контроле и опыте, мл; 1,1 – количество углекислоты, эквивалентное 1 мл 0,05 н. кислоты, мг; S – площадь почвы под сосудом-изолятором, м²; t – экспозиция, час.

Определение биологической активности почвы по методу Т.В. Аристовской, М.В. Чугуновой

Способ заключается в том, что в увлажненную до пастообразного состояния почву вносят легкодоступное для микроорганизмов органическое вещество – мочевины, при разложении которой под действием ферментов типа уреаз образуется большое количество щелочи – аммиака. Над образцом изучаемой почвы помещают влажную полоску индикаторной бумаги (кусочек фильтровальной бумаги, пропитанной универсальным индикатором, или любой другой индикаторной бумаги с широким диапазоном выявляемых значений рН) с рН, близким к нейтральному. По мере разложения мочевины и улетучивания аммиака воздушная среда над почвой приобретает щелочную реакцию, и индикаторная полоска изменяет окраску. Пользуясь соответствующей колориметрической шкалой, визуально устанавливают зависимость величины рН индикаторной полоски от времени экспозиции и по характеру полученной зависимости судят о биологической активности почвы. В почвах с высокой биологической активностью повышение рН на 1,0 – 1,5 ед. обнаруживается уже через 1 ч после начала опыта.

Самостоятельная работа

1. Исследование целлюлазной и протеолитической активности почвы.
2. Изучение биологической активности почвы по накоплению аминокислот на полотне.
3. Оценка интенсивности дыхания почвы.
4. Изучение биологической активности почвы по методу Аристовской и Чугуновой.
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Целлюлазная и протеолитическая активность почвы.

В зимний период времени студенты знакомятся с оценкой биологической активности почвы по результатам лабораторного опыта в вегетационных сосудах. Для определения интенсивности разложения целлюлозы стерильную тонкую льняную ткань (неотбеленную) пришивают к полимерной пленке (пищевой полиэтилен). Ширина отрезка пленки 10 см, а длина 25 – 30 см (под-

бирается в зависимости от размеров вегетационного сосуда). Стерилизуют пленку этиловым спиртом.

Пленка вставляется в почву так, чтобы верхняя грань ткани была на 3 – 5 см погружена в почву. Необходимо ставить 5 повторных полотен. По истечении времени экспозиции (2 – 4 недели) полотна извлекают, отмывают от почвы и продуктов полураспада, подсушивают и взвешивают. По убыли массы судят об интенсивности разрушения клетчатки.

Начальную массу ткани узнают путем определения средней массы 25 см² ткани и затем соответствующего расчета. Для оценки интенсивности разрушения целлюлозы (%) используют следующую шкалу:

| очень слабая | слабая | средняя | сильная | очень сильная |
|--------------|---------|---------|---------|---------------|
| < 10 | 10 - 30 | 30 - 50 | 50 - 80 | > 80 |

При изучении протеолитической активности почвы лучше всего использовать фотобумагу на жесткой основе (картон) или рентгеновскую пленку. Для лучшей фиксации края пленки загибают на обратную сторону стекла и приклеивают клейкой лентой. Во избежание повреждения желатинового слоя фотобумагу при закладке в почву желательно помещать в чехол из газовой ткани (мельничный газ).

После извлечения и высушивания пластинок студенты подсчитывают число пятен разложения на желатине, которое при наличии соответствующего количества параллельных образцов может служить основой для сравнения протеолитической активности почвы. Кроме того, на таких пластинках возможно изучать окислительно-восстановительный режим, складывающийся в почве, так как в анаэробных условиях происходит восстановление серебра фоточувствительной эмульсии. При изучении восстановительных зон фотобумагу в пакетах из газовой ткани выдерживают в почве не так долго, как при определении протеолитической активности. Оптимальный срок экспозиции – 48 ч. После извлечения фотобумаги из почвы и очистки от загрязнений ее немедленно помещают в фиксирующий 25%-й раствор гипосульфита. Фиксированную фотобумагу можно хранить длительное время.

Работа 2. Накопление свободных аминокислот на полотне.

При наличии времени студенты выполняют выемку полотен из почвы вегетационных сосудов, подсушивают ткань, щеточкой счищают приставшую к ней почву. Подготовку ткани выполняют в резиновых перчатках (!), чтобы предотвратить попадание на нее белков и аминокислот с кожи рук. Нужно ставить контрольное определение и, если на ткани перед опытом обнаруживаются аминокислоты и белки, ее необходимо промыть 70%-м этиловым спиртом.

Ткань опрыскивают 0,5%-м раствором нингидрина в ацетоне и высушивают для быстрого проявления окраски в сушильном шкафу при 60 – 80⁰С.

По интенсивности окраски отдельных частей ткани судят об интенсивности микробиологических процессов. Для этого студенты могут использовать уже готовые демонстрационные полотна.

Работа 3. Измерение интенсивности дыхания почвы.

100 г почвы естественной влажности помещают в герметически закрывающиеся склянки (малые эксикаторы). Ставят на нее бюксы с 25 мл 0,1 н. раствора NaOH для поглощения выделяющейся углекислоты, закрывают крышками и помещают в термостат на 24 часа. Контролем служат бюксы с 25 мл NaOH, помещенные в склянки без почвы. После инкубации к раствору NaOH приливают 2,5 мл 50%-го раствора BaCl₂ для осаждения углекислоты и титруют 0,1 н. раствором HCl. Разница между количеством HCl, пошедшей на титрование NaOH контроля и опыта, составляет количество NaOH, связанное углекислотой (1 мл 0,1 н. HCl соответствует 2,2 мг CO₂). Затем выполняют пересчет на абсолютно сухую почву. Интенсивность дыхания выражается в миллиграммах углекислоты на 100 г почвы.

Работа 4. Изучение биологической активности почвы по методу Аристовской и Чугуновой.

В три чашки Петри диаметром 10 см вносят по 45 – 50 г увлажненной до пастообразного состояния почвы и по 0,125 г мочевины (в зависимости от типа изучаемой почвы количество вносимой мочевины варьируют: для бедных органическим веществом почв – 0,5 – 1,0 г, а для степных почв – 1,0 – 2,0 г мочевины). Содержимое чашек тщательно перемешивают и равномерно распределяют по дну. К внутренней поверхности каждой крышки перед тем, как накрыть ею чашку, прикрепляют по влажной полоске фильтровальной бумаги, пропитанной универсальным индикатором, при рН 6,5. Находящаяся во влажном состоянии бумага прочно удерживается на стекле и не соприкасается с поверхностью почвы. Во избежание ее быстрого высыхания чашки помещают в эксикатор с водой. В качестве контроля в эксикатор помещают чашки без почвы, но с мочевиной (слегка увлажненной) и с индикаторной полоской на крышке.

Студенты просматривают чашки через каждые полчаса и отмечают время, потребовавшееся для повышения рН индикаторной полоски до 7,0; 7,5; 8,0. На основании наблюдений делают заключение о биологической активности почвы.

В протоколе исследования должны быть сделаны рисунки полотна с пятнами аминокислот (или вклеены фотографии), приведены выводы по опытам. Следует выполнить описание методики постановки опыта по накоплению аминокислот на полотне и определения интенсивности дыхания почвы.

Контрольные вопросы

1. Что такое биологическая активность почвы, зачем ее определяют?
2. Какие методы применяют для изучения биологической активности почвы?
3. Опишите метод накопления аминокислот на льняном полотне.
4. Опишите методику определения дыхания почвы.

Список литературы

1. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. - С. 276 - 278.
2. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 123 – 124.

Занятие 12. Биотические взаимоотношения микроорганизмов

Цель занятия. Ознакомление с некоторыми распространенными типами взаимоотношений в микробных ассоциациях.

План занятия. 1. Изучение антагонистических и конкурентных взаимоотношений между микроорганизмами.

2. Изучение паразитических и мико(бактерио)литических взаимодействий между микроорганизмами.

3. Знакомство с явлением симбиоза в мире микроорганизмов.

4. Самостоятельная работа: исследование различными методами антагонистических, паразитических, симбиотических и иных типов взаимоотношений между микроорганизмами; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Демонстрационные чашки Петри с посевами смешанных культур микроорганизмов. Предметные стекла с совместной культурой микробов. Пробирки с культурой мицелиального гриба и миколитическими бактериями. Образцы чайного гриба, кефирных грибков, слоевища лишайника. Микроскопы. Иммерсионное масло. Метиленовая синь в капельницах. Стекла предметные. Микробиологические петли и иглы. Колбы-промывалки. Тетради для высушивания мазков. Пинцеты. Кусочки пенопласта. Глицерин. Покровные стекла.

Пояснения к занятию

Чистых культур микробов в природе, как правило, не встречается, если только речь не идет об экосистемах с экстремальными условиями. Чаще всего микробиологу приходится иметь дело с микробным сообществом, которое представляет собой совокупность взаимодействующих между собой микроорганизмов.

Стержнем структурно-функциональной организации микробных сообществ являются взаимоотношения входящих в их состав организмов, обусловленные трофическими связями и изменениями условий окружающей среды. В процессе эволюции между отдельными видами микроорганизмов, входящими в состав микробоценозов, сложились сложные взаимосвязи, обеспечившие заселение конкретного субстрата определенными микробными сообществами. Пути взаимодействий в сообществе обычно разветвлены и опосредованы прямыми и обратными, положительными и отрицательными, трофическими и топическими связями.

Экологи выделяют шесть основных возможностей взаимовлияния двух партнеров, если принять, что каждый из них может быть либо нейтральным по отношению к другому, либо влиять на него положительно или отрицательно.

Нейтрализм – взаимодействие, при котором каждая из популяций никак не влияет на скорость роста другой популяции.

Комменсализм – в присутствии первой популяции вторая растет быстрее, но это никак не отражается на скорости роста первой.

Метабиоз – это комменсализм в пищевой цепи, когда последующий член пищевой цепи получает выгоду от деятельности предыдущего. Метабиоз – широко распространенное явление в мире микроорганизмов. Ярким примером ме-

табиоза является взаимодействие аммонификаторов и нитрификаторов, когда аммиак, образующийся в результате жизнедеятельности аммонифицирующей микрофлоры, служит необходимым субстратом для развития нитрификаторов.

Аменсализм – в присутствии первой популяции рост второй замедляется, но это никак не отражается на скорости роста первой.

Мутуализм – две популяции не только взаимно ускоряют рост численности друг друга, но и друг без друга существовать не могут.

Конкуренция – при совместном сосуществовании скорость роста каждой из популяций оказывается меньше, чем в отсутствие конкурента. Активную конкуренцию между различными организмами называют антагонизмом. *Антагонизм* – весьма распространенное явление. В его основе лежат различные причины: конкуренция за пищевой субстрат (исчерпание питательных веществ), физико-химические изменения среды (подкисление или подщелачивание, потребление кислорода), выделение в окружающую среду протеолитических ферментов, токсинов, антибиотиков. Наибольшее число антагонистов с широким спектром действия обнаружено у актиномицетов. Значительный удельный вес среди антагонистов составляют и гифальные грибы (рис. 22).

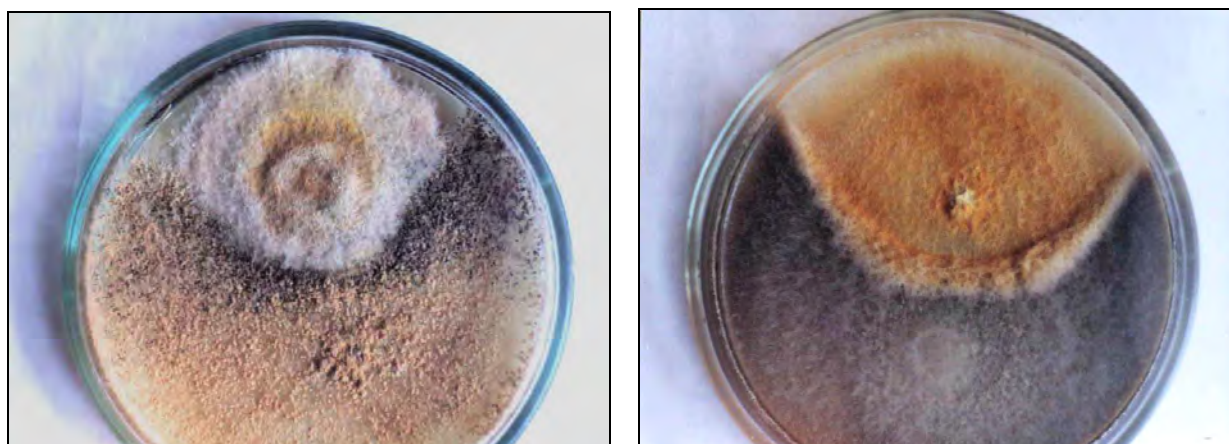


Рис. 22. Антагонистические взаимоотношения между гифомицетами (грибы-антагонисты демонстрируют удушающие и фунгистатические свойства к более слабому конкуренту). «Зенит» с насадочным кольцом. Оригинал

Особенно в этом отношении выделяются пенициллы и аспергиллы. Большинство бактерий-антагонистов приходится на споровые формы. Антагонисты встречаются и среди неспорообразующих бактерий (представители рода *Pseudomonas*, молочнокислые бактерии, уробактерии, азотобактер и др. виды).

Паразитизм и хищничество – взаимодействие сводится к тому, что для паразита и хищника хозяин или жертва служат пищей. Паразитизм и хищничество рассматриваются как антагонизм, который в короткий срок может существенно изменить структуру микробоценоза и его суммарный метаболизм.

Хищный образ жизни ведут некоторые почвенные бактерии и грибы. Для этих целей у них выработались специальные морфологические приспособления. Так, бактерии рода *Caulobacter* имеют стебельки, с помощью которых

прикрепляются к клетке-жертве. Хищные грибы из рода *Arthrobotrys* (дейтеромицеты) питаются нематодами при помощи специальных ловчих колец, образующихся на их мицелии.

Паразитизм присущ представителям разных групп прокариотных и эукариотных организмов. Паразиты выявлены среди простейших, грибов, бактерий, вирусов. Паразитизм грибов на грибах получил название гиперпаразитизма (рис. 23).



Рис. 23. Гиперпаразитизм грибов: триходерма формирует спороношение на колонии гриба (слева); белый стерильный мицелий паразитирует на колонии конкурента (справа). «Зенит» с насадочным кольцом. Оригинал

Среди паразитических бактерий наиболее известен *Vdellovibrio bacteriovorus*, который обладает широким спектром хозяев. Он паразитирует на грамотрицательных и некоторых грамположительных бактериях. Бделловибрионы широко распространены в природе и играют существенную экологическую роль в формировании численности и стабильности бактериальных сообществ.

Реальное многообразие взаимоотношений видов в реальной обстановке значительно превосходит упомянутые здесь шесть типов межпопуляционных взаимодействий. Микробиологи обычно подразделяют взаимоотношения между микроорганизмами на индифферентные (нейтрализм), симбиотические и конкурентные (антагонизм).

Изучение типов взаимоотношений между микроорганизмами важно, так как некоторые из них используются человеком на практике. Например, явления антагонизма, паразитизма и хищничества находят практическое применение в сельском хозяйстве для экологизации и биологизации защиты растений и животных от вредных объектов, в медицине для получения и применения антибиотиков и пробиотиков.

В природных экосистемах очень сложно установить характер взаимоотношений микроорганизмов друг с другом. Трудности связаны с малыми размерами и слабой морфологической дифференцировкой микроорганизмов.

В связи с этим типы взаимоотношений между различными микроорганизмами изучаются в лабораторных условиях путем применения различных методов, в том числе моделирования микробных ассоциаций.

Самостоятельная работа

1. Исследование антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами методом совместной культуры на агаровых питательных средах в чашках Петри и предметных стеклах.
2. Изучение гиперпаразитической активности почвенных грибов.
3. Обнаружение миколитических и бактериолитических форм микроорганизмов в составе почвенной микрофлоры.
4. Изучение симбиотических ассоциаций «чайный гриб», «кефирные зерна», лишайник.
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Антагонистические взаимоотношения между микроорганизмами.

В чашки Петри наливают расплавленную агаровую среду (МПА или другую) и после застывания густо засевают культурой какой-либо бактерии. Через некоторое время (12 - 24 часа) на ту же чашку наносят в разных местах чистую культуру другого микроорганизма (например, актиномицета) в виде блоков агаровой среды (блоки вырезают стерильным пробочным сверлом), на которой этот микроорганизм хорошо развился. Чашки Петри с наложенными на поверхность газона бактерии агаровыми блоками ставят в термостат при температуре 30⁰С. Если первая форма равномерно разрастается по всей поверхности чашки, значит, второй микроорганизм не обладает по отношению к ней антагонистическими свойствами. Если же вокруг блоков с подсеянным микроорганизмом образуются зоны отсутствия роста, следовательно, эта форма выделяет антибиотические вещества и вступает в антагонистические отношения с первой формой.

Для выявления почвенных микробов-антагонистов чашку Петри с агаровой средой густо засевают изучаемым микроорганизмом (тест-объект) и на нее по трафарету наносят равномерно несколько комочков почвы. Если в составе почвенной микрофлоры имеются антагонисты, то вокруг почвенных комочков возникнут зоны отсутствия роста тест-организма. Хорошие результаты можно получить при густом засеве МПА почвенной болтушкой из разведения 1:100 или 1:1000 (метод скученной популяции). Через несколько дней почвенные бактерии разрастаются сплошным слоем по всей поверхности чашки, но вокруг некоторых колоний можно видеть четкие стерильные зоны.

Антагонистические взаимоотношения можно изучать на предметных стеклах (по методу А. Имшенецкого), облитых агаровой средой соответствующего состава. Для этого стерильные предметные стекла погружают в чашку с расплавленным агаром, вынимают и держат наклонно. На стеклах остается слой агара толщиной около 1 мм. Полученные агаровые пластинки засевают изучаемым микроорганизмом (жидкая культура распыляется из пульверизатора над предметными стеклами) и затем обсыпают почвенной пылью. Параллельно часть предметных стекол со слоем агара обсыпается только почвенной пылью и служит контролем. Засеянные таким образом предметные стекла помещают в

чашки Петри и выдерживают при 35⁰С 2 – 3 дня. Если микроорганизм (желательно использовать культуру *Serratia marcescens* или *Pseudomonas fluorescens*) обладает антагонистическими свойствами в отношении почвенных микробов, то он уменьшает энергию развития и размеры колоний, образующихся вокруг почвенных частичек. Число и размеры колоний определяют под микроскопом на площади стекла, равной 2 см².

Работа 2. Гиперпаразитическая активность почвенных грибов.

На поверхность картофельно-глюкозного агара в чашках Петри по методу встречных культур уколom иглы высевают споровую суспензию гриба-гиперпаразита (грибы рода *Trichoderma*, белые стерильные мицелии или другие гифомицеты, обладающие гиперпаразитической активностью) и споровую суспензию гриба-жертвы (лучше всего для опыта подходят фитопатогенные почвенные грибы из родов *Fusarium* и *Helminthosporium*). Чашки с посевами помещают на 7 - 10 дней в термостат при 27 – 30⁰С. После инкубации чашки вынимают из термостата и сначала визуальнo изучают характер взаимоотношений гиперпаразита с жертвой, оценивая в баллах площадь колонии жертвы, захваченную гиперпаразитом (1 балл – гиперпаразит занимает до 25% площади; 2 балла – 25 – 50%; 3 балла – 51 – 75%; 4 балла – гиперпаразит полностью покрывает колонию гриба), а затем готовят на предметном стекле препарат «раздавленная капля» из зоны взаимодействующих мицелиев и при объективе 20 – 40^x изучают характер повреждений мицелия и спороношений жертвы.

Работа 3. Мико- и бактериолитические формы почвенных микроорганизмов.

Способностью растворять (лизировать) мицелий грибов обладают некоторые почвенные бактерии, получившие название миколитических. Для их обнаружения закладывают серию пробирок с картофельным отваром (в каждой пробирке по 5 мл отвара). Пробирки засевают споровой суспензией гриба *Helminthosporium sativum* и выращивают в течение 3 суток в термостате при 27⁰С. Затем готовят почвенную суспензию и вносят ее в разведении 1:100 (1:1000) в пробирки с культурой гриба с помощью стерильной пипетки в количестве 1 мл. Если гриб успевает затянуть пленкой мицелия поверхность среды, то пленку прокалывают кончиком пипетки. В контрольные пробирки добавляется к культуре гриба 1 мл дистиллированной стерильной воды. После засева пробирок почвенной суспензией их снова инкубируют в термостате в течение 5 суток.

По окончании срока инкубации пробирки осматривают и дают описание наблюдаемой картины, регистрируя состояние пленки мицелия гриба, степени ее развития, ослизнения и разрушения, наличие осадка на дне пробирок, степени помутнения среды, состояние погруженного мицелия гриба. Затем подготавливают из контрольной и опытной пробирок препараты «раздавленная капля» и изучают под микроскопом состояние мицелиальных структур гриба. Отмечают лизированные гифы и скопления бактериальных клеток возле них.

Для обнаружения бактериолитических форм (в частности бактериофагов) среди почвенной микрофлоры выращивают на безазотной агаровой среде Эшби культуру азотобактера сплошным газоном. Когда бактериальный налет покрывает всю поверхность агара, на него засевают культуру специально подо-

бранного актиномицета или накладывают комочки почвы в разных местах чашки. При наличии в почве бактериофага или других бактериолитических форм вокруг комочков почвы будет наблюдаться просветление. При установлении истинной причины исчезновения азотобактера необходимо выполнить микроскопию, так как нередко в бактериальном налете усиленно развиваются различные Protozoa, поедающие бактерий. В последнем случае можно наблюдать и явление хищничества.

Работа 4. Симбиотические взаимоотношения между микроорганизмами.

Студенты готовят препараты «раздавленная капля» из «чайного гриба», просматривают с сухой системой и отмечают форму и сочетание клеток различных микроорганизмов.

С микрофлорой кефирных грибков лучше ознакомиться на окрашенном мазке. В состав кефирных зерен входят: молочнокислые стрептококки, ароматообразующие кокки, молочнокислые палочки, молочнокислые дрожжи. Тело кефирного грибка переплетено нитями палочковидного микроба. Кефирные грибки представляют собой продукт длительного культивирования молочнокислых бактерий, в результате чего произошел стойкий симбиоз. Палочковидный микроб, переплетающий тело кефирного грибка, на обычных средах не растет и в чистом виде пока не выделен.

Кусочек кефирного грибка помещают между предметными стеклами, прижимают и растягивают вдоль. Полученные мазки-отпечатки высушивают, фиксируют и окрашивают метиленовым голубым в течение 2 – 3 мин.

Лишайники рассматриваются как своеобразная группа симбиотических организмов, в теле которых сочетаются два компонента: автотрофный фикобионт (водоросль) и гетеротрофный микобионт (гриб).

Для ознакомления со строением лишайников студенты используют небольшие кусочки таллома коллемы (*Collema*) или лептогиума (*Leptogium*), предварительно выдержанные в течение 1,5 – 2 ч в теплой воде с глицерином. Таллом зажимают между двумя кусочками пенопласта и делают бритвой несколько срезов. Из наиболее тонких готовят микропрепарат в глицерине. Препарат рассматривают сначала при малом, а затем при большом увеличении микроскопа, находят гифы микобионта и лежащие между ними талломы водорослей.

В протоколе исследования зарисовывают характер проявления антагонизма между микроорганизмами, выросшими в скученной популяции на чашке (или вклеивают фотоснимок), записывают результаты измерения колоний на стеклах и делают письменные выводы. Дают оценку гиперпаразитической активности гриба и описывают микроскопическую картину взаимодействий гиперпаразита и жертвы. Выполняют описание характера проявления миколитической активности бактерий (пробирки опыта и микроскопическую картину можно зарегистрировать на фотопленку, а затем вклеить фотоснимки в протокол). Зарисовывают микроскопическую картину мазка-отпечатка из кефирного грибка, выполняют рисунок участка среза таллома лишайника при большом увеличении. В заключение выполняют описание шести основных типов взаимодействий между организмами.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные типы взаимодействий между организмами, охарактеризуйте их.
2. Какие методы изучения антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами Вы знаете?
3. Где на практике могут использоваться антагонистические, паразитические и иные формы взаимоотношений между микроорганизмами? Приведите примеры.
4. Опишите методику постановки опыта по выявлению миколитической и бактериолитической активности почвенных микроорганизмов.

Список литературы

1. Практикум по систематике растений и грибов / Под ред. А.Г. Еленевского. – М.: Издательский центр «Академия», 2001. – С. 149 - 152.
2. Федоров М.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М., 1951. – С. 204 – 208.

Занятие 13. Микрофлора филлосферы растений

Цель занятия. Ознакомление с составом и особенностями эпифитных микроорганизмов, методами изучения эпифитов и микробно-растительных взаимодействий в филлосфере растений.

План занятия. 1. Ознакомление с биоэкологическими особенностями эпифитной микрофлоры.

2. Изучение состава и количества эпифитной микрофлоры растений методом смыва и методом отпечатков.

3. Знакомство с различными типами микробно-растительных взаимодействий в филлосфере растений (комменсализм и паразитизм).

4. Самостоятельная работа: определение состава и количества эпифитных микроорганизмов в филлосфере культурных злаков, исследование способности эпифитных микроорганизмов продуцировать биологически активные вещества, оценка ингибирующей способности клеточного сока разных видов растений на прорастание спор фитопатогенных грибов; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Вегетационные сосуды или растильни с 10 – 15-суточными растениями пшеницы, ячменя. Стерильная водопроводная вода в колбах и пробирках для посева методом разведений. Пипетки. Чашки Петри с агаризованной питательной средой. Демонстрационные чашки Петри с семенами растений, обработанные культуральной жидкостью эпифитов. Весы. Стекла во влажных камерах со спорами головневых грибов в каплях сока различных растений. Микроскопы. Стекла предметные и покровные. Фуксин. Масло иммерсионное. Таблицы и подборки фотографий, отражающие состав и особенности эпифитной микрофлоры растений.

Пояснения к занятию

Для эколога знакомство с эпифитной микрофлорой имеет не меньшее значение, чем изучение микрофлоры почвы, воды, воздуха и других местообитаний.

Эпифитные микроорганизмы могут использоваться для биоиндикации состояния экосистем, так как их жизнь тесно связана с изменением факторов окружаю-

шей среды. Они оказывают существенное влияние на рост и развитие растений, качество семян и другой растениеводческой продукции, способны вступать в антагонистические отношения с фитопатогенными организмами, что в ряде случаев позволяет применять их для контроля численности вредных объектов.

Изучение сукцессий эпифитов в условиях антропогенных стрессов расширяет и углубляет наши представления об экологических нишах видов и их параметрах, позволяет прогнозировать смену экологических ниш в сообществах, что важно при поиске путей управления популяциями микроорганизмов.

Микрофлора филлосферы растений – довольно специфичная группа микроорганизмов, имеющая свои характерные особенности. Среди характерных черт ассоциаций эпифитов выделим следующие: 1 – обилие дрожжей, дрожжеподобных организмов и темноцветных гифомицетов (семейство *Dematiaceae*), 2 – доминирование среди прокариот бациллярных форм, 3 – низкая встречаемость в филлосфере растений актиномицетов, 4 – высокая устойчивость к фитонцидам растений.

Дрожжи и дрожжеподобные грибы представлены родами *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* (колонии розовые и оранжево-красные), *Cryptococcus* (колонии беловатые или бежевые), *Trichosporon*, *Pullularia* (колонии с субстратным мицелием по краям) и др. Среди мицелиальных грибов ведущее место занимают виды родов *Cladosporium*, *Alternaria* и стерильные мицелии (рис. 24).

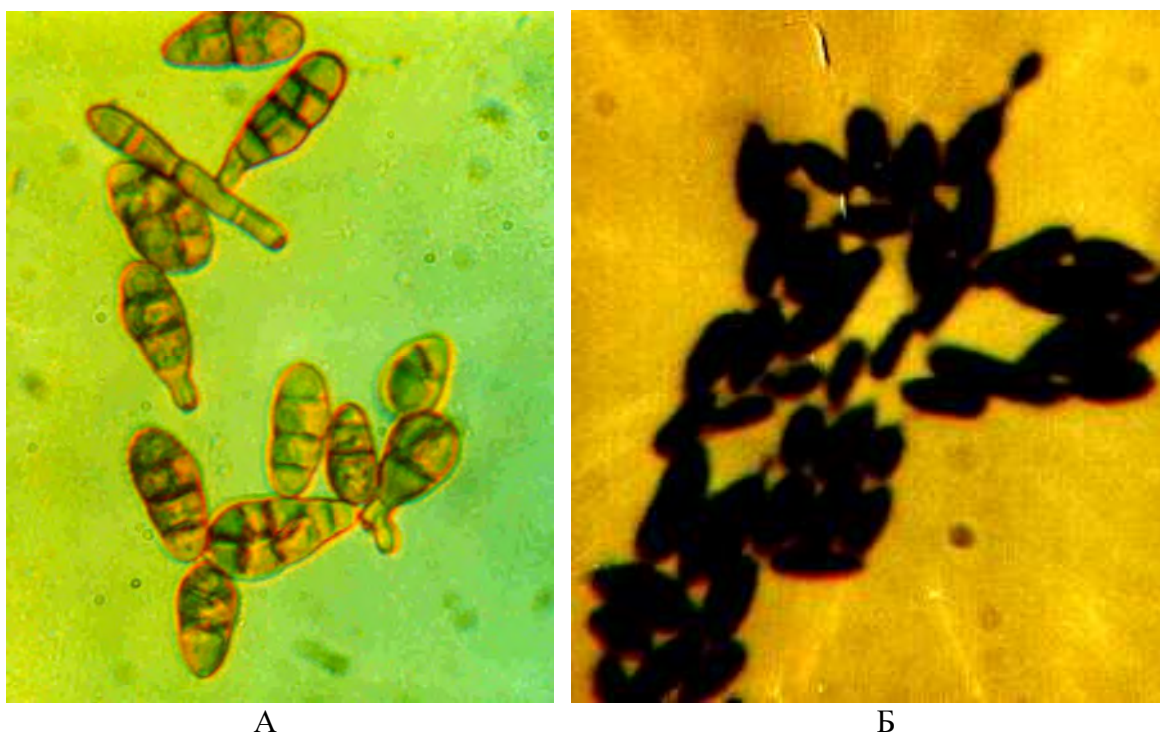


Рис. 24. Типичная микрофлора филлосферы растений: А – темноцветный гифомицет р. *Alternaria*; Б – дикие дрожжи. Об. 40 и 90, ок. 10. Оригинал

Способность колонизировать филлосферу растений обусловлена такими характеристиками микроорганизмов, как размеры и морфология, структура поверхности клетки, способность выживать в условиях низкой влажности, при воздействии света и фитонцидов, довольствоваться скудными запасами пита-

тельных материалов, развиваясь за счет нормальных выделений тканей растения и имеющихся на его поверхности небольших количеств органических загрязнителей [22].

Жизненный цикл эпифитов на протяжении длительного времени протекает в воздушной среде, которая накладывает на сообщество микроорганизмов филлосферы неизгладимый отпечаток. Численность и разнообразие микрофлоры существенно зависят от вида растения, его возраста и местообитания, климата, погодных условий и некоторых других обстоятельств. Количество бактерий и грибов на поверхности растений во время вегетации не всегда одинаково. Как правило, количественные изменения идут в сторону нарастания общей численности микроорганизмов от весны к осени. Роль дрожжей и гифальных грибов возрастает по мере развития листьев. На стареющих и старых листьях грибная флора весьма многочисленна и нередко доминирует. У тех растений, которые интенсивнее выделяют продукты обмена на поверхность тканей, микрофлора богаче и разнообразнее.

Значительно увеличивается количество микроорганизмов на растениях после дождя, во влажную погоду, в сухую, наоборот, уменьшается. Погодные условия отражаются и на качественном составе эпифитной микрофлоры. После дождя обильно размножаются в филлосфере злаков дрожжи, а своеобразными индикаторами повышенных температур воздуха и незначительного количества осадков являются представители двух родов гифомицетов - *Curvularia* и *Aspergillus*. В зависимости от температуры и относительной влажности воздуха могут происходить изменения в группе доминирующих микроорганизмов.

Благодаря непредсказуемости изменений воздушной среды естественный отбор способствует формированию популяций видов с широкими экологическими нишами. Разнообразие сообществ микроорганизмов, населяющих листья и стебли растений, как правило, невелико, хотя видовое богатство может быть в отдельных случаях достаточно высоким. На поверхности листьев культурных злаков в условиях Зауралья только микроскопических грибов встречается от 20 до 40 видов, тем не менее, видовое богатство консорциев эпифитов еще не свидетельствует о высоком разнообразии, поскольку особи между видами распределены крайне неравномерно.

Такой же неравномерностью отличается расположение клеток на поверхности листа. Между микроколониями и отдельными клетками остаются значительные пространства, которые легко могут быть заняты случайно занесенной микрофлорой.

Имеет свои особенности и распределение микроорганизмов на верхней и нижней стороне листа. Существенную роль в этом играют свет и температура. Локализация микроорганизмов на поверхности листьев растений может быть видоспецифичной. Не исключено, что это связано с выделением растениями через устьица некоторых веществ, в частности ЛОВ (летучих органических веществ), которые могут служить энергетическими субстратами для микроорганизмов.

Еще одной характерной особенностью сообщества эпифитных микроорганизмов является преобладание в филлосфере растений слизиобразующих и пигментных форм, более устойчивых к низкой влажности воздуха и действию солнечной радиации.

Отмеченная выше высокая встречаемость бациллярных форм бактерий и обилие стерильных мицелиев среди грибного населения филлосферы злаков тоже являются следствием своеобразной реакции эпифитов на постоянно меняющиеся условия окружающей среды. Известно, что споры бактерий более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов, чем вегетативные клетки, а обрывки мицелия грибов, возможно, эффективнее распространяются в воздушном потоке или лучше задерживаются на поверхности листьев.

Среди эпифитов можно найти различные физиологические группы микроорганизмов. Например, в значительных количествах на поверхности листьев растений встречаются возбудители молочнокислого брожения (*Lactobacter plantarum*, *Streptococcus lactis* и др.), денитрифицирующие бактерии (род *Pseudomonas*), однако большинство эпифитов являются типичными аммонификаторами.

При колонизации поверхности растения микроорганизмами в филлосфере возникают сложные и разнообразные микробно-растительные взаимодействия. Сапротрофная эпифитная микрофлора обычно строит свои взаимоотношения с растением по типу комменсализма. Многие из эпифитов способны синтезировать различные биологически активные вещества (аминокислоты, витамины, ростовые вещества типа ауксинов и гиббереллинов, антибиотики), принося растению определенную пользу. Предполагается, что эпифитные микроорганизмы и растение обмениваются информационными «сигналами» в виде сигнальных молекул, которые помогают эпифиту успешно колонизировать растение.

Не менее распространенной в филлосфере растений является другая форма микробно-растительных взаимодействий – паразитизм. Проникновение патогена внутрь растения происходит различными способами, например, через устьица или за счет активного разрушения ферментами покровных оболочек. Главное, что привлекает патогена – это питательные вещества растения-хозяина, которые он включает в свой метаболизм. Растение хотя и не имеет специальной иммунной системы, тем не менее не остается нейтральным, так или иначе реагируя на агрессию со стороны патогенного микроорганизма. Важную роль в защитных реакциях играют синтезируемые растениями низко- и высокомолекулярные соединения с антимикробной активностью (фитоалексины и другие защитные вещества).

Качественный и количественный состав микрофлоры филлосферы растений, особенности микробно-растительных взаимодействий изучают с помощью соответствующих методов. Среди наиболее распространенных методов исследования микроорганизмов, населяющих надземную поверхность растений, отметим методы смыва и отпечатков (реплик). Смыв клеток микроорганизмов с поверхности листьев производят, помещая целые листья или их части в колбы со стерильной водой и встряхивая их в течение 10 мин, после чего делают высев на питательные среды.

Отпечатки получают прямыми и опосредованными методами. Прямые методы основаны на снятии клеток эпифитов с исследуемой поверхности различными адгезивными материалами: коллодиевой пленкой, липкой целлофановой лентой и т.д. Полученные отпечатки затем просматривают под микроскопом.

Опосредованные методы предполагают получение отпечатков листовых пластинок или их частей на поверхности питательных сред. Если лист большого размера, то к нему прижимают приготовленную среду, пользуясь методом агаровой колбаски. Колбаски делают из разных питательных агаров, запечатывая их стерильно в пергаментную обертку. Перед использованием верхнюю часть колбаски срезают острым стерильным ножом и плотно прижимают стерильную поверхность среза к исследуемому объекту. Срезая последовательно круглые ломтики, их по четыре размещают в стерильные чашки Петри и проращивают во влажной камере (рис. 25).

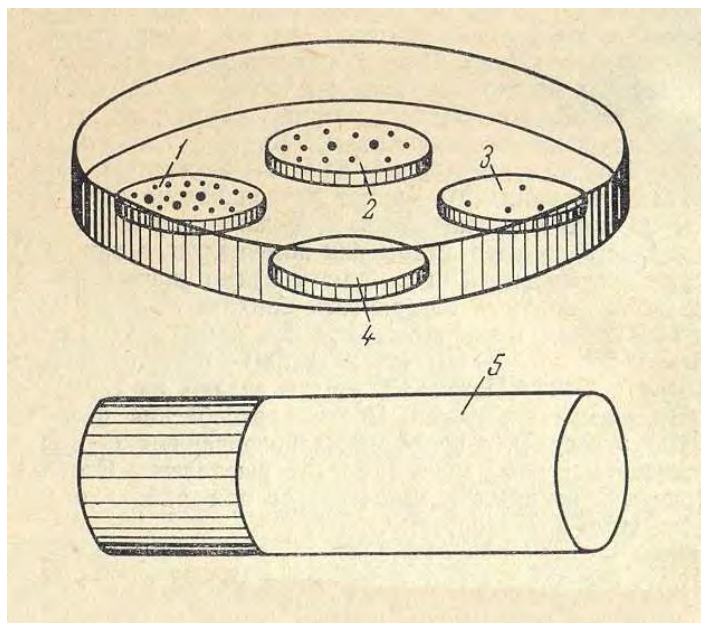


Рис. 25. Метод «агаровой колбаски» (по Бабьевой И.П., Голубеву В.И.): 1, 2, 3 – блоки с последовательными отпечатками, 4 - контрольный блок, 5 – агаровая колбаска

Отпечатки можно получать с помощью мягких пластичных материалов, таких как бархат, замша, из которых делают круглые подушечки - репликаторы. Лучше всего использовать для этих целей бархат велюр, белый или бледно-желтый (другие краски могут быть токсичными). Бархат первоначально кипятят, затем вырезают из него круглые шаблоны и наклеивают их на алюминиевые диски такого размера, чтобы они помещались в чашки Петри. Стерилизуют их завернутыми в бумагу сухим жаром при 160°C 1 ч. Перед использованием поверхность бархата смачивают жидкой питательной средой и прикладывают его к исследуемому объекту на несколько секунд. Затем снимают (не сдвигая!) и переносят в чашку Петри на питательную среду. Следует отметить, что для выращивания эпифитных микроорганизмов необходимо применять питательные среды на растительных отварах. На обычном мясопептонном агаре типичные эпифиты развиваются очень медленно. К наиболее распространенным средам для культивирования эпифитов относятся капустный агар, агар на бобовом отваре, картофельный и сенной агары.

Самостоятельная работа

1. Исследование микроорганизмов филлосферы методом смыва и отпечатков.
2. Изучение биологической активности культуральных фильтратов эпифитных бактерий.
3. Изучение взаимодействия растения и фитопатогенного гриба.
4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование микроорганизмов филлосферы методом смыва и отпечатков.

Для учета эпифитов методом смыва берут навеску листьев растений пшеницы или ячменя, выращенных в вегетационных сосудах, массой 5 г. Листья можно разрезать на кусочки площадью 1 см² и поместить в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды (можно добавить 2 – 3 г песка). Жидкость в колбе взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Исходный смыв в колбе принимают за разведение 1:100. Из полученной вытяжки готовят разведения, а затем высевают из соответствующих разведений на картофельно-глюкозный или фасолевый агар (1 мл суспензии при глубинном посеве). Возможна модификация метода, когда 1 г листьев вносят в колбы со 100 мл дистиллированной воды.

При работе методом серийных отпечатков в стерильной чашке Петри стерильным скальпелем получают отрезки листьев 1-2 см длиной, а затем переносят их на поверхность питательной среды и отпечатывают, прижимая скальпелем. Посев делают последовательно на 3-5 чашек. Чашки инкубируют при температуре 23⁰С в течение 3-5 суток и последние два дня их оставляют на столе при дневном освещении для лучшей пигментации колоний. Выросшие колонии подсчитывают. На демонстрационных чашках студенты могут познакомиться с типичными эпифитными микромицетами и бактериями, сделав препараты из 3 – 4 характерных колоний.

Работа 2. Исследование биологической активности эпифитных микроорганизмов.

Заранее отобранные штаммы эпифитных микроорганизмов выращивают в течение определенного времени (обычно 7 – 10 дней) в жидкой питательной среде в колбах. Культуральную жидкость отделяют от микробной массы фильтрованием или центрифугированием. Фильтрат разбавляют дистиллированной водой. Разведения культуральной жидкости могут быть 1:200, 1:400, 1:600 (подбираются индивидуально для каждого микроорганизма). Фильтрат разливают по 10 мл в стаканы или бюксы и в каждом из них замачивают по 20 крупных или 50 мелких семян растений в течение 24 часов. После замачивания семена раскладывают на увлажненную фильтровальную бумагу в чашки Петри и проращивают в течение 5 – 7 суток (при постоянном контроле увлажнения). По истечении указанного срока подсчитывают число проросших и непроросших семян и измеряют длину проростков и корней. О стимулирующем влиянии культуры судят по ростовым эффектам. Оказавшими положительное влияние считают такие культуры, которые стимулируют прорастание семян, корней и проростков не менее, чем на 20% по сравнению с контролем.

Работа 3. Оценка ингибирующего влияния клеточного сока разных видов растений на прорастание спор гриба.

В каплю выжатого клеточного сока на предметном стекле из пшеницы и ячменя, разбавленного (1:7) дистиллированной водой, вносят препаративной

иглой телиоспоры твердой головки ячменя (*Ustilago hordei*). Контролем служит дистиллированная вода. Стекла помещают во влажную камеру. Через 3 дня учитывают (не менее 5 полей зрения) число проросших спор. По итогам анализа делают вывод об устойчивости растений.

В протоколе исследования студенты записывают методику учета численности и состава эпифитных микроорганизмов методом смыва и отпечатков. Зарисовывают внешний вид типичных представителей эпифитов под микроскопом.

Контрольные вопросы

1. Какую микрофлору называют эпифитной, какими особенностями она обладает?
2. Назовите типичных представителей микрофлоры филлосферы растений.
3. Какие типы микробно-растительных взаимодействий встречаются в филлосфере растений, могут ли они использоваться на практике?
4. Опишите методику определения биологической активности эпифитных микроорганизмов.

Список литературы

1. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. – Л.: Колос, 1969. – 239 с.
2. Евсеев В.В. Эпифитная микрофлора зерновых агроэкосистем. – Курган: Типография «ДАММИ», 2006. – С. 14 – 31, 98 - 105.

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ В БИОСФЕРЕ

Микроорганизмы – наиболее многочисленные обитатели биосферы, занимающие все доступные для жизни экологические ниши. Особенности экологии микроорганизмов определяются их преимущественно химическим взаимодействием со средой обитания. Обладая высокой химической активностью, они представляют важнейшую геологическую силу, причем речь идет не только о взаимодействии с горными породами или о процессах минералообразования, но прежде всего об участии их в процессах деструкции и минерализации органического вещества как природного, так и антропогенного происхождения. В глобальном цикле углерода активность микроорганизмов сопоставима с активностью фотосинтезирующих организмов (все виды брожений контролируются микроорганизмами), а биогеохимический цикл метана практически полностью зависит от деятельности микрофлоры, продуцирующей и потребляющей метан. Не вызывает сомнения также, что микроорганизмы, в особенности азотфиксаторы и нитрификаторы первой и второй фазы, играют ведущую роль в глобальном цикле азота, а водород- и углеводородокисляющие бактерии являются основными потребителями водорода, жидких и газообразных углеводородов в аэробных условиях. Значительна роль микроорганизмов в глобальном цикле серы (на этапе восстановления сульфатов до сероводорода) и окислительно-восстановительных реакциях преобразования элементов с переменной валентностью (железо, фосфор, марганец и др.) [22].

В задачу данного раздела входит ознакомление студентов-экологов лишь с ключевыми, важнейшими для биосферы (в частности для почвы) микробиологическими процессами и их возбудителями. Традиционные для общей микробиологии занятия по возбудителям молочнокислого и спиртового брожения, окисления этилового спирта в уксусную кислоту и некоторым другим микроорганизмам преднамеренно в раздел не включены, так как эта микрофлора находит преимущественное использование в микробиологической и пищевой промышленности, и меньше интересует эколога в сравнении с микрофлорой типичных природных экосистем.

Микроорганизмы, участвующие в круговороте биогенных элементов в биосфере, изучаются на занятиях в виде элективных (накопительных) культур. Техника накопительных культур была предложена С.Н. Виноградским и М. Бейеринком. Для получения таких культур создают элективные условия выращивания (аэрацию, температуру, кислотность и состав питательных сред), которые обеспечивают преимущественное развитие необходимого исследователю микроорганизма.

Занятие 14. Микроорганизмы, участвующие в круговороте углерода в природе

Цель занятия. Ознакомление с возбудителями маслянокислого брожения, брожения пектиновых веществ и целлюлозы, окисления клетчатки и углеводов, методами получения их элективных культур.

План занятия. 1. Ознакомление с биоэкологическими особенностями типичных возбудителей маслянокислого брожения.

2. Изучение элективной культуры возбудителей брожения пектиновых веществ и целлюлозы.

3. Знакомство с микрофлорой, окисляющей клетчатку и углеводороды в аэробных условиях.

4. Самостоятельная работа: изучение накопительных культур указанных выше микроорганизмов; оформление протокола исследования.

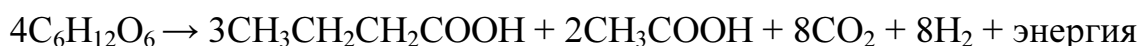
Оборудование и материалы. Культура маслянокислых бактерий на картофеле в высоких пробирках. Культура возбудителей брожения пектиновых веществ в пробирках. Культура микроорганизмов, окисляющих клетчатку в колбах. Культура углеводородокисляющих микроорганизмов в колбах. Петли микробиологические. Стекла предметные и покровные. Раствор Люголя в капельницах. Фуксин. Микроскопы. Пинцеты. Масло иммерсионное. Таблицы: возбудители маслянокислого брожения, возбудители брожения пектиновых веществ, возбудители брожения целлюлозы, возбудители окисления клетчатки.

Пояснения к занятию

Углерод – важнейший элемент органической природы. Он является неотъемлемой частью всех живых организмов. Зеленые растения ежегодно потребляют колоссальное количество углекислоты. Если бы в природе отсутствовали источники пополнения атмосферы углеродом, то вскоре жизнь полностью бы затихла.

Основным источником пополнения атмосферы углекислотой является жизнедеятельность микроорганизмов. Многие микробы разлагают органические вещества животных и растительных остатков на более простые, вплоть до углекислоты и воды. Эти превращения весьма многообразны по своей химической природе.

Маслянокислое брожение – одно из звеньев деструкционной ветви в круговороте углерода. В результате брожения происходит минерализация сложных безазотистых органических веществ, а атмосфера обогащается углекислотой. Маслянокислое брожение наблюдается повсюду в тех местах, где безазотистые органические вещества разлагаются при отсутствии кислорода. При этом образуется масляная и уксусная кислота, выделяются газы:



При смещении реакции в кислую сторону (до pH 5,5) образуется в больших количествах бутиловый спирт и ацетон. Для возбудителей этого процесса маслянокислое брожение есть способ получения необходимой энергии. Энергетическим материалом служат крахмал, водорастворимые углеводы, органические кислоты и спирты (глицерин). В качестве источника азота бактерии используют различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые представители обладают уникальной способностью фиксировать молекулярный азот атмосферы.

Возбудители маслянокислого брожения имеют вид крупных **спорных палочек** (10 – 12 мкм) веретеновидной формы, **слегка подвижные, грамположительные, облигатные анаэробы**, содержат большое количество гранулы. В природе они встречаются в почве, навозе, на различных предметах (рис. 26).



Рис. 26. *Clostridium pasteurianum*

Основными возбудителями маслянокислого брожения являются *Clostridium pasteurianum*, *Cl. butylicum*, *Cl. butyricum*.

Для изучения маслянокислого брожения используется картофельная среда. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кусочками, которые помещают в большую микробиологическую пробирку (21x2см), затем добавляют 1/3 чайной ложки мела, на 2/3 объема заливают водопроводной водой и ставят на 10 мин в водяную баню, температура которой должна быть 80°C. После пастеризации пробирки переносят в термостат на 2 – 3 суток.

Маслянокислое брожение пектиновых веществ. Большое значение для минерализации растительных тканей имеет процесс анаэробного распада пектиновых веществ. Пектиновыми веществами называют межклеточные вещества, цементирующие клетки при образовании растительных тканей.

Анаэробный распад пектина протекает по типу маслянокислого брожения через многие промежуточные продукты. В конечном итоге образуется масляная и уксусная кислоты, водород, метан, углекислый газ. При определенных условиях могут образовываться спирты, ацетон и другие вещества. Брожение пектиновых веществ используется при первичной обработке волокнистых растений (лён, конопля, кенаф и др.). Ферменты возбудителей брожения пектиновых веществ – пектиназы – используются в пищевой промышленности при ферментации растительного сырья и получении пектина.

Возбудители маслянокислого брожения пектиновых веществ – **облигатные анаэробы. Они подвижны, образуют споры** (рис. 27); сбраживают пектин, крахмал, глюкозу, но не сбраживают целлюлозу. К источникам азота малотребовательны. Хорошо усваивают минеральные формы азота.

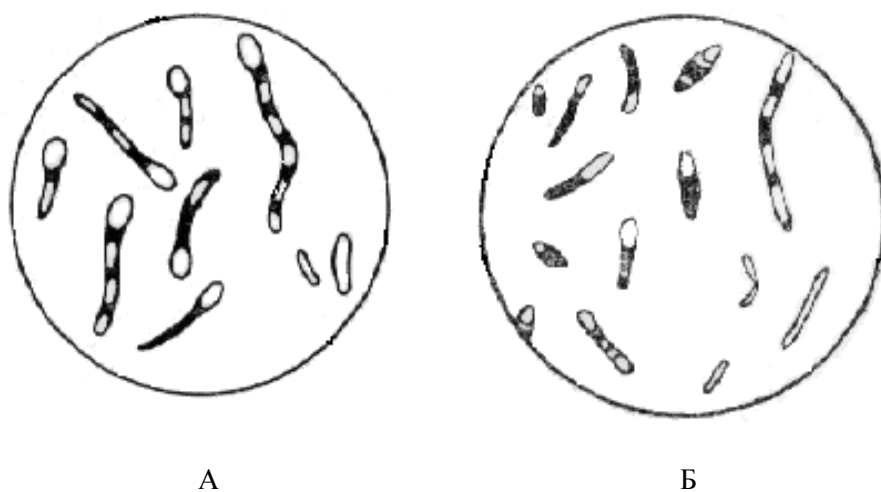


Рис. 27. Возбудители брожения пектиновых веществ:
А - *Clostridium pectinovorum*; Б - *Clostridium felsineum*

Для получения культуры возбудителей брожения пектиновых веществ снопик льняной соломы высотой 6 – 7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в высокие пробирки, наполненные на 2/3 водопроводной водой, кипятят 2 – 3 мин для удаления веществ, которые могут служить источником углерода для других маслянокислых бактерий. Воду сливают и вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Так поступают 5 – 6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном и в снопик вводят свежий стебель, не подвергавшийся нагреванию. Пробирки со снопиком ставят в термостат при 30⁰С. Через пять дней брожение заканчивается.

Маслянокислое брожение целлюлозы. Целлюлоза, или клетчатка, является одной из главных составных частей оболочек растительных клеток (50%) и встречается в природе в огромных количествах. Это соединение относится к числу наиболее стойких веществ и может противостоять действию даже сильных кислот и оснований. Микроорганизмы могут минерализовать целлюлозу в аэробных и анаэробных условиях. При воздействии фермента целлюлазы, про-

дуцируемого целлюлозоразлагающими бактериями, она гидролизуется и переходит в глюкозу: $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$.

Анаэробный распад целлюлозы идет по типу маслянокислого брожения под влиянием различных спорообразующих бактерий, распространенных в почве, навозе, рубце жвачных животных. Возбудителями являются представители рода *Clostridium* – *Cl. omelianskii*, *Cl. dissolvens* (ранее их называли возбудителями метанового и водородного брожения целлюлозы и относили к роду *Vacillus*).

Брожение целлюлозы – звено круговорота углерода в природе. Промежуточные и конечные продукты распада легко вовлекаются в различные превращения, освобождающаяся углекислота используется растениями в процессе фотосинтеза.

Для получения накопительной культуры возбудителей брожения целлюлозы в плоскодонную колбу вносят около 2 г фильтровальной бумаги и заливают доверху средой Омелянского (г/л): K_2HPO_4 – 1; $MgSO_4$ – 1; $NaCl$ – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 2; $CaCO_3$ – 2; пептон – 5.

Среду заражают небольшим количеством почвы и закрывают колбу корковой пробкой с отверстием для выхода газов.

Элективные условия определяются присутствием целлюлозы, которая может потребляться только специфичными бактериями, имеющими фермент целлюлазу, и анаэробными условиями. Пептон, введенный в среду в небольшом количестве, не нарушает элективности среды, но стимулирует процесс.

При температуре $30^{\circ}C$ брожение длится 2 – 3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания ослизняется, желтеет и постепенно разрушается.

Окисление клетчатки. Аэробное разложение клетчатки имеет такое же широкое распространение в природе, как и анаэробное. Возбудители очень разнообразны – это бактерии, грибы, актиномицеты, но чаще всего встречаются бактерии рода *Cellvibrio* – короткие, слегка изогнутые палочки, выделяющие охряно-желтый пигмент, бактерии рода *Cellfalcicula* – короткие палочки с заостренными концами и утолщенные в центре, выделяющие зеленый пигмент, бактерии рода *Cythorhaga* – тонкие, слегка изогнутые клетки, при старении они переходят в укороченные палочки, а затем и в шаровидные формы – микроспоры или микроцисты. Цитофаги относятся к миксобактериям. Способны образовывать на клетчатке колонии в виде желтых, розовых и коричневых пятен.

Представители указанных родов являются **подвижными, неспорообразующими, грамотрицательными, аэробными** бактериями.

Окисление клетчатки протекает сложно, в несколько этапов. Вначале клетчатка под действием выделяемого фермента целлюлазы гидролизуется до сахаров, а затем сахара окисляются молекулярным кислородом до оксикислот, которые в дальнейшем окисляются до конечных продуктов: CO_2 и H_2O . Кроме оксикислот выделяются и уроновые кислоты, участвующие в образовании гумуса.

Для наблюдений над аэробным процессом разрушения клетчатки в эрленмейеровскую колбочку объемом 200 мл наливают около 30 мл раствора, содержащего NH_4Cl – 0,1%; K_2HPO_4 – 0,05% в водопроводной воде, и погружают в этот раствор складчатый фильтр конусом вверх. Добавив затем немного мела, заражают раствор небольшим комочком почвы и ставят в термостат с температурой около $30^{\circ}C$.

Энергичное разрушение бумаги происходит на границе жидкости, где диффузия кислорода наиболее легкая. Бумага постепенно покрывается желтыми и коричневыми пятнами, а также спороношениями грибов, ослизняется и расплывается.

Окисление углеводов. В углеводах концентрируется значительная часть углерода. Поэтому разложение их составляет важный этап в круговороте углерода. Большинство природных углеводов частично или полностью окисляется микроорганизмами. Способностью к расщеплению углеводов обладают многие бактерии и грибы: псевдомонады, акинетобактерии, микобактерии, артробактерии, бациллы и дрожжи (*Candida*, *Rhodotorula*).

Микробному превращению подвергаются и газообразные углеводороды: метан, этан, пропан, бутан. Они используются микроорганизмами как источник углерода. Микроорганизмы, окисляющие газообразные углеводороды, объединяются в особую группу – метилотрофы.

Знакомство с углеводородоокисляющими микроорганизмами представляет для эколога определенный интерес, так как эта микрофлора накапливается в природных субстратах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, и может использоваться для биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов.

Для получения накопительной культуры углеводородоокисляющих микроорганизмов в качалочную колбу на 750 мл вносят 100 мл синтетической минеральной среды (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 10; K_2HPO_4 – 10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,013; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,012; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,012. Для углеводородоокисляющих бактерий рН среды устанавливают на уровне 6,8 – 7,0, а для дрожжей – 4,5 – 5,0. В колбу вносят 2 мл жидкого n-парафина и инокулируют небольшим количеством почвы, загрязненной нефтепродуктами. Колбу помещают на качалку (200 об/мин) на 3 – 5 суток.

Наличие смеси углеводов в среде в качестве единственного источника углерода создает селективные условия, а хорошая аэрация способствует активному развитию накопительной культуры.

Самостоятельная работа

1. Исследование селективной культуры маслянокислых бактерий.
2. Знакомство с возбудителями брожения пектиновых веществ и клетчатки.
3. Изучение селективной культуры микроорганизмов, окисляющих клетчатку.
4. Изучение селективной культуры углеводородоокисляющих бактерий (дрожжей).
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование культуры маслянокислых бактерий на картофеле.

На картофельной среде исследование культуры маслянокислых бактерий (род ***Clostridium***) начинают через 2 – 3 дня после постановки опыта. К этому времени картофельная среда становится мутной, на ее поверхности появляются пузырьки газа. В процессе брожения образуются CO_2 и H_2 , которые поднима-

ются вверх, а вместе с ними и кусочки картофеля. Пипеткой отбирают со дна пробирки немного культуральной жидкости и по каплям наносят на предметное стекло, где готовят препарат «придавленная капля» с постановкой гранулезной реакции (реакция на йод). При микроскопии культуры в препарате «придавленная капля», в которую добавлена капелька раствора Люголя, маслянокислые бациллы окрашиваются в темно-синий цвет. На картофельной среде в плазме микробных клеток накапливается крахмалоподобное вещество гранулеза, которое при соприкосновении с раствором йода дает темно-коричневое (или темно-синее) окрашивание. На одном из концов веретенообразных клеток хорошо видны неокрашенные споры.

Работа 2. Исследование культуры возбудителей брожения пектиновых веществ и клетчатки.

Льняной снопок извлекают из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и выжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с масляной иммерсией. Крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования и прерывистым расположением гранулезы (опоясанные палочки) принимают за *Clostridium pectinovorum*. Палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце, равномерно окрашенные йодом в темно-синий (коричневый) цвет, принимают за *Cl. felsineum*.

Для изучения представителей брожения целлюлозы извлекают пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле без добавления воды. Мазок сушат на воздухе, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином. На препарате можно видеть длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце – *Clostridium omelianskii*.

Работа 3. Изучение аэробной целлюлозоразлагающей микрофлоры.

Разлагающийся складчатый фильтр вначале осматривают и отмечают на нем спороношения плесневых грибов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др.), а также цветные пятна бактериального происхождения. Затем фильтр извлекают из колбы, переносят его в чашку Петри и вырезают из него кусочки (в зоне цветных пятен) скальпелем или препаровальными иглами. Кусочки фильтра помещают между двумя предметными стеклами и раздавливают, слегка растирая бумагу. Затем стекла разнимают, удаляют кусочки бумаги, подсушивают, фиксируют на пламени горелки и красят фуксином. На таком препарате можно наблюдать разнообразную микрофлору с преобладанием того микроорганизма, который вызвал энергичное окрашивание бумаги.

Работа 4. Изучение углеводородокисляющих бактерий (дрожжей).

При наличии углеводородокисляющих бактерий через несколько дней в колбе наблюдается помутнение среды и слабое желтоватое окрашивание. Из содержимого колбы готовят фиксированный, окрашенный фуксином препарат и микроскопируют с масляной иммерсией. На препарате могут обнаруживаться палочковидные бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и др. В случае изучения дрожжей готовят препарат «раздавленная капля», окрашенный метиленовой синью, и микроскопируют с объективом 40^X.

В протоколе исследования студенты выполняют рисунки микроскопической картины просмотренных препаратов, отражают морфологические особенности возбудителей процессов трансформации углеродсодержащих соединений и некоторые культуральные свойства. В частности в протокол исследования зарисовывают внешний вид складчатого фильтра с развившимися на нем целлюлозоразлагающими микроорганизмами. Для каждой группы возбудителей необходимо дать краткую характеристику (морфология клетки, наличие спор, окраска по Граму и т.п.).

Контрольные вопросы

1. Объясните понятие «элективная культура»?
2. Какие физиологические особенности микроорганизмов надо знать для создания элективных условий выращивания?
3. Назовите типичных представителей маслянокислого брожения, дайте им краткую характеристику.
4. Назовите представителей брожения пектиновых веществ и целлюлозы, какое значение имеют они в природе?
5. Опишите методику получения накопительной культуры аэробных целлюлозоразрушающих бактерий.
6. Какая микрофлора принимает участие в окислении углеводов, где она может использоваться на практике?

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 81 – 85, 113 – 115.
2. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 73 – 81.

Занятие 15. Аммонификация белковых веществ и мочевины

Цель занятия. Ознакомление с одним из ключевых звеньев в круговороте азота – аммонификацией и ее возбудителями, методами получения накопительных культур аммонифицирующих бактерий.

План занятия. 1. Знакомство с процессом аммонификации, его значением в природе и жизни человека.

2. Изучение возбудителей аммонификации белковых веществ: аэробных и анаэробных аммонифицирующих бактерий.

3. Знакомство с уробактериями – аммонификаторами мочевины и хитина.

4. Самостоятельная работа: изучение накопительных культур аммонифицирующих бактерий, морфологии и культуральных свойств типичных представителей; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Культура аммонифицирующих бактерий на МПБ в пробирках. Культура уробактерий в колбах. Микроскопы. Масло иммерсионное. Петли микробиологические. Фуксин основной в капельницах. Стекла предметные. Чашки сливные с мостиками. Колбы с водой для промывки мазков. Тетради для высушивания мазков. Чашки Петри с посевами типичных аммонифицирующих микробов. Таблицы: возбудители аммонификации (аэробы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы), возбудители аммонификации мочевины.

Пояснения к занятию

Азотистые вещества в природе находятся в форме органических и минеральных соединений. Органические соединения входят в состав гумуса, растительных и животных остатков, а также в состав живых организмов. Минеральные соединения азота представлены солями азотной, азотистой кислот, аммонийными солями. Велики запасы в природе молекулярного азота. Все эти соединения в природе подвергаются постоянным изменениям. Из органических форм они превращаются в минеральные формы и наоборот. Эти превращения осуществляются в основном микробами, которые участвуют в круговороте азота в природе.

Аммонификация белковых веществ. Распад белковых соединений сопровождается выделением аммиака и называется аммонификацией. Процесс аммонификации (или гниения) широко распространен в природе, в нем участвуют бактерии, грибы, актиномицеты. Эта богатая и разнообразная физиологическая группа микроорганизмов получила общее название аммонификаторов. Микроорганизмы используют продукты распада белков как источник азота, углерода и энергии. Следовательно, аммонификация – это акт дыхания и питания.

Разложение белков начинается с их гидролиза под действием ферментов протеаз и протекает по схеме: белок → пептоны → пептиды → аминокислоты → аммиак.

Аммонификация может протекать в аэробных и анаэробных условиях. Если процесс идет при доступе кислорода, то аминокислоты могут полностью окисляться микроорганизмами до аммиака, углекислого газа, сероводорода и воды. В анаэробных условиях аминокислоты распадаются не полностью. Поэтому кроме NH_3 и CO_2 накапливаются различные органические кислоты, амины и другие соединения, в том числе и ядовитые птомаины (индол, скатол и др.).

Аммонификацию свежего материала начинают почвенные бактерии. По мере потребления легко доступных соединений развитие их замедляется, численность снижается. Доминирующее положение начинают занимать бациллы, обладающие более активными гидролитическими ферментами. На смену им приходят актиномицеты, которые способны использовать даже труднодоступные для микроорганизмов гумусовые вещества в качестве единственного источника азота и углерода. Завершают процесс минерализации плесневые грибы.

Процесс аммонификации имеет огромное значение в природе и жизни человека. Численность аммонифицирующих бактерий, а также отдельные доминирующие виды бацилл могут служить одним из достоверных показателей биологической активности почв. Интенсивность минерализации органических веществ в почве в значительной мере определяется численностью и активностью аммонификаторов и обуславливает степень обеспеченности почвы минеральными соединениями азота, а последние – эффективное плодородие почвы. Микробы-аммонификаторы выполняют важную санитарную функцию в биосфере, очищая различные природные среды (почву, воду и др.) от мертвого белка, утилизируют трупы животных, насекомых, растений. Отдельные аммонифицирую-

щие бактерии служат индикаторами санитарного состояния объектов окружающей среды. Процесс аммонификации используется человеком, например, при обработке кожевенно-мехового сырья. Вместе с тем, многие аммонификаторы являются возбудителями пороков пищевого сырья и продуктов питания, могут быть причиной кишечных инфекций у животных и человека.

Для количественного учета аммонификаторов применяют мясопептонные среды МПА и МПБ.

Для постановки накопительной культуры используют мясной бульон с повышенным содержанием пептона (3%). Этот бульон разливают в большие пробирки по 10 мл в каждую и заражают почвой. Для обнаружения аммиака между пробкой и стенкой пробирки зажимают розовую лакмусовую бумажку и белую фильтровальную, смоченную раствором уксуснокислого свинца, сверху пробирку покрывают пергаментной бумагой, перетягивают резинкой и ставят в термостат на 2 - 3 дня. При наличии аммиака розовая лакмусовая бумажка синее, сероводорода – чернеет.

Характеристика основных представителей аммонификации

Аэробные аммонификаторы:

1. *Корневая или грибовидная бацилла (Bacillus mycoides)* – один из распространенных почвенных микроорганизмов (рис. 28). В поле зрения видны цепочки палочек с овальной спорой на одном конце, которая по форме напоминает ракетку. Окрашивается по Граму. Подвижная (перитрих).

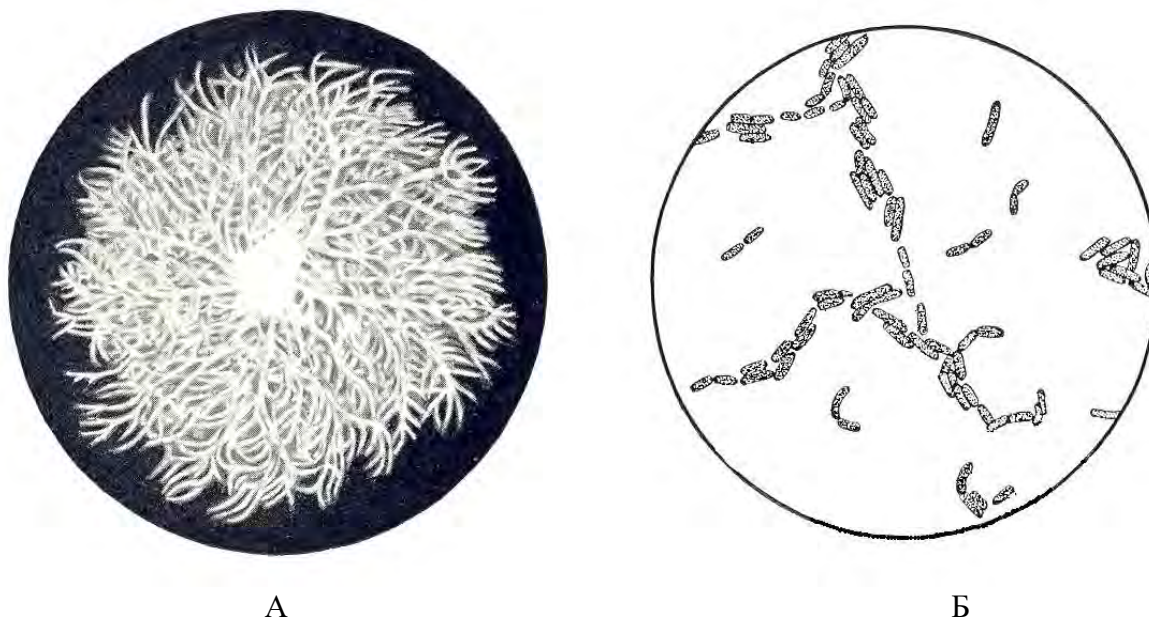


Рис. 28. Bacillus mycoides: А – колонии на МПА; Б – клетки в начале образования спор

На МПА колония разветвленная, по форме напоминает ветвления корней или мицелий грибов. На МПБ рост в виде кусочка ваты, который расположен на дне пробирки, сама среда остается прозрачной. Образует аммиак, свертывает молоко.

2. *Картофельная бацилла (Bac. mesentericus)* – палочка с овальной спорой на конце, располагается одиночно, иногда цепочкой. По Граму окрашивается положительно, подвижная (рис. 29).



Рис. 29. Колонии *Bacillus mesentericus* на МПА

На МПА образует сухие, складчатые, матовые колонии. На МПБ рост на поверхности в виде сухой складчатой пленки.

3. *Капустная бацилла (Bac. megatherium)* – крупные палочки, расположенные в цепочку, окрашиваются по Граму положительно (рис. 30).

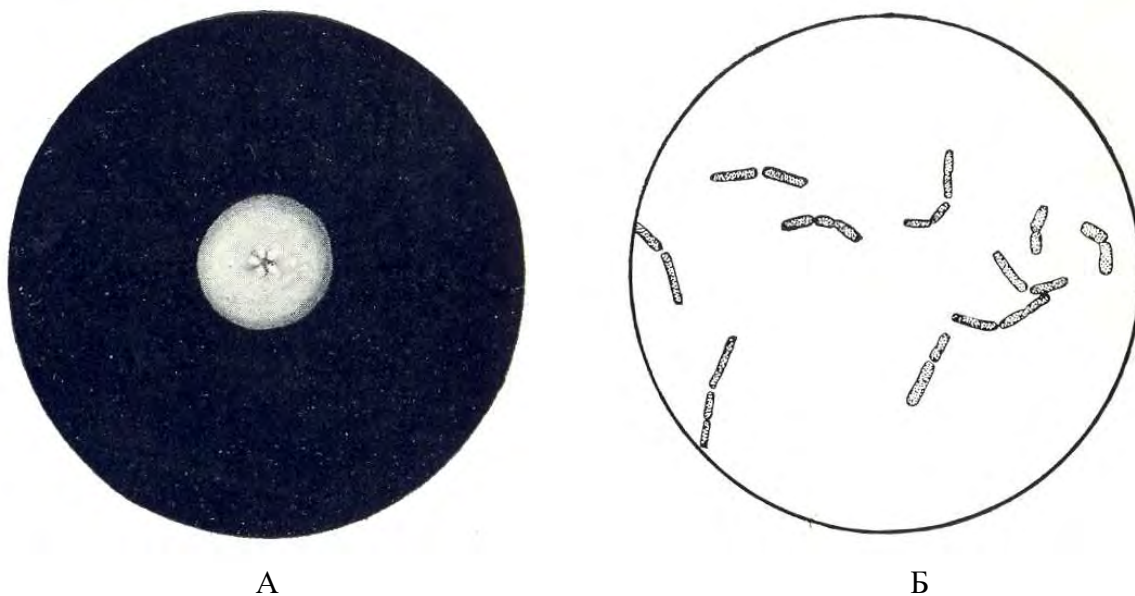


Рис. 30. *Bacillus megatherium*: А – колония на МПА; Б – молодые палочковидные клетки с закругленными концами

На МПА образует гладкие, жирно блестящие, редко складчатые колонии. Края колоний слабоволнистые. На МПБ образует слабую муть, выделяет сероводород, аммиак.

4. *Чудесная палочка (Serratia marcescens)* – мелкая, грамотрицательная, подвижная палочка. На МПА колонии круглые, возвышенные в центре, красного цвета, блестящие, слизистой консистенции. Края колонии ровные. На МПБ интенсивная муть красного цвета.

Факультативно – анаэробные микробы

1. *Вульгарный протей (Proteus vulgaris)* – клетки полиморфные, на питательных средах меняют свою форму и размеры (поэтому микроорганизм и получил свое название Proteus – от мифического бога Протея, наделенного способностью к сказочным превращениям), грамотрицательные, подвижные (перитрихи). Палочки часто расположены цепочкой. В старых культурах формируют длинные характерно загнутые в виде петли нити. Спор и капсул не образуют (рис. 31).



Рис. 31. Вульгарный протей: А – длинные и короткие палочки;
Б - петлеобразные нити в старых культурах

На МПА колонии слегка блестящие, края извилистые. Во время роста микроб может перемещаться по влажной питательной среде. На МПБ рост культуры в виде равномерной мути. Образуется сероводород, аммиак.

2. *Кишечная палочка (Escherichia coli)* – постоянный обитатель желудочно-кишечного тракта. Форма клетки в виде короткой, толстой с закругленными краями палочки. Спор и капсул не образует. Грамотрицательная. Встречаются подвижные и неподвижные штаммы.

На МПА колонии круглые, прозрачные, с голубоватым оттенком. На МПБ равномерная серая муть. Образует аммиак, сероводород, индол.

Анаэробные микробы

1. *Clostridium putrificus*. На одном конце образует спору, что придает бактерии форму барабанной палочки. Клетки располагаются чаще одиночно, подвижные (перитрихи), грамположительные (рис. 32).



Рис. 32. *Clostridium putrificus*

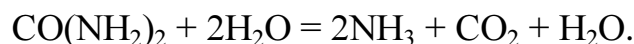
На МПА растет в глубине среды в виде рыхлых хлопьевидных колоний. Образует сероводород, аммиак, индол. Сахара не разлагает. Встречается в почве, гниющих продуктах, кишечнике животных.

2. *Clostridium sporogenes* – палочки с закругленными краями, образуют овальную спору, которая располагается часто в центре клетки. Окрашивается по Граму, подвижный (перитрихи).

На МПА в анаэробных условиях образует круглые, вязкие, не обладающие прозрачностью колонии. Выделяет большое количество сероводорода. Содержится в почве, кишечнике.

Аммонификация мочевины. Значительная часть белкового азота, принимаемого с пищей человеком и животными, выделяется ими с мочой, в которой содержится около 2% мочевины. Ежедневно в почву поступают сотни тысяч тонн азота мочи. Мочевина непригодна для азотного питания растений, и только после разложения при участии бактерий она становится усвояемой растениями.

Бактерии, вызывающие аммонификацию мочевины, получили название уробактерий (уреа – моча). Они вырабатывают фермент уреазу, который гидролизует мочевины до аммиака:



Для получения накопительной культуры уробактерий можно использовать питательную среду, состоящую из МПБ и 10% мочевины. Среду разливают по 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл, заражают небольшим количеством навоза и ставят в термостат при 27⁰С. Через пять суток на поверхности среды появляется едва заметная бактериальная пленка.

Большинство уробактерий являются аэробами. По форме бывают шаровидные и палочковидные. Более энергичный распад мочевины производят палочковидные бактерии. К ним относится ***Bacillus pasteurii***. Это подвижный микроорганизм, спорообразующий, грамположительный, образует колонии серовато-грязного оттенка. Способен разложить до 140 г мочевины в 1 л раствора.

Planosarcinia ureae – шаровидный микроб, менее активный в биохимическом отношении. Спорообразующий, подвижный, грамположительный.

Для аммонификаторов мочевины характерна способность развиваться в щелочной среде (алкалофильные микроорганизмы).

Самостоятельная работа

1. Исследование элективной культуры аммонифицирующих бактерий.
2. Знакомство с отдельными возбудителями процесса аммонификации.
3. Изучение элективной культуры уробактерий.
4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование культуры аммонифицирующих бактерий на МПБ.

Изучение культуры микробов-аммонификаторов проводят путем микроскопирования, для этого из культуральной жидкости готовят мазок и окрашивают фуксином Пфейффера. Рекомендуется капли жидкости брать бактериологической петлей с разной глубины – одну капельку с поверхности жидкости в пробирке (в верхних слоях преимущественное развитие получают аэробы), затем петлю погружают поглубже (для обнаружения факультативных анаэробов) и каплю жидкости переносят на предметное стекло, добавляя к первой. Последнюю каплю захватывают петлей из наиболее глубоких слоев жидкости, погружая петлю на всю длину проволоочки.

В поле зрения микроскопа видны самые разные по форме и величине микроорганизмы (аэробы и анаэробы). По внешнему виду легко распознаются картофельный и грибовидный бацилл, протей (короткие тонкие палочки или нити), кишечная палочка (короткие, почти кокковидные, толстые палочки с закругленными концами), палочка чудесной крови (очень мелкие и тонкие палочки), клостридии в форме барабанных палочек (*Cl. putrificus*) или клеточечков (*Cl. sporogenes*).

Работа 2. Изучение демонстрационных посевов микробов-аммонификаторов.

Студенты исследуют посевы чистых культур аммонификаторов в пробирках (на скошенном МПА) или чашках Петри – кишечной палочки, протей, грибовидного и картофельного бацилла, палочки чудесной крови. Отмечают характерные культуральные особенности и готовят на предметных стеклах мазки, окрашенные фуксином. Микроскопию выполняют с масляноиммерсионной системой.

В протоколе исследования необходимо сделать рисунки в овалах, в каждом овале изобразив группу аэробов, факультативных анаэробов, облигатных анаэробов. Дать им характеристику. Схематично зарисовать пробирки с изменившимися цветом под действием продуктов аммонификации индикаторными бумажками. Описать значение процесса аммонификации в природе и жизни человека.

Работа 3. Изучение элективной культуры уробактерий.

Из колбочек с накопительными культурами уробактерий отбирают с наиболее интенсивным развитием пленки. Затем готовят препарат «раздавленная капля» и просматривают его под микроскопом. Отбор проб проводят стерильными пипетками. Из пленки можно также приготовить мазок на предметном стекле и окрасить его фуксином. Микроскопическую картину зарисовывают.

Контрольные вопросы

1. Что такое аммонификация, какое значение имеет этот процесс в природе и жизни человека?
2. Назовите типичных возбудителей процесса аммонификации, дайте им краткую характеристику.
3. Назовите возбудителей аммонификации мочевины, опишите их биоэкологические особенности.
4. Опишите методику получения элективной культуры аммонификаторов.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 104 – 106, 119 – 122.
2. Тешпер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 83 – 85.

Занятие 16. Процессы нитрификации и денитрификации

Цель занятия. Ознакомление с процессами нитрификации и денитрификации, их возбудителями, методами получения элективной культуры нитрифицирующих бактерий.

План занятия. 1. Знакомство с процессами нитрификации и денитрификации, их значением в природе и жизни человека.

2. Изучение возбудителей I и II фазы нитрификации.

3. Знакомство с денитрифицирующими бактериями.

4. Самостоятельная работа: изучение накопительных культур нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий, описание характера их роста, приготовление фиксированных препаратов, микроскопия и зарисовка морфологии возбудителей изучаемых процессов; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Колбы Эрленмейера с культурами нитрифицирующих бактерий (1–я и 2–я фазы). Пробирки с накопительной культурой денитрифицирующих бактерий. Микроскопы. Микробиологические петли. Фуксин основной в капельницах. Предметные стекла. Чашки сливные с мостиками. Колбы-промывалки. Масло иммерсионное. Таблицы: возбудители 1–й и 2–й фаз нитрификации, основные денитрификаторы.

Пояснения к занятию

Процесс нитрификации. Окисление аммиака до азотной кислоты через промежуточную стадию азотистой кислоты называется *нитрификацией*.

Процесс протекает в две фазы, идущие последовательно:

I фаза $2\text{NH}_3 + 3\text{O}_2 = 2\text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{энергия}$;

II фаза $2\text{HNO}_2 + \text{O}_2 = 2\text{HNO}_3 + \text{энергия}$.

Нитрификация имеет важное значение для плодородия почвы, так как нитратная форма азота хорошо усваивается растениями.

Возбудители процесса нитрификации были открыты С.Н.Виноградским и оказались широко распространенными в природе.

Первую фазу нитрификации – окисление аммония до азотистой кислоты – возбуждают бактерии родов **Nitrosomonas**, **Nitrospira**, **Nitrosocystis**. Это бактерии палочковидной формы, размеры их около 1,5x1 мкм, грамотрицательные, спор не образуют, очень подвижные (рис. 33).

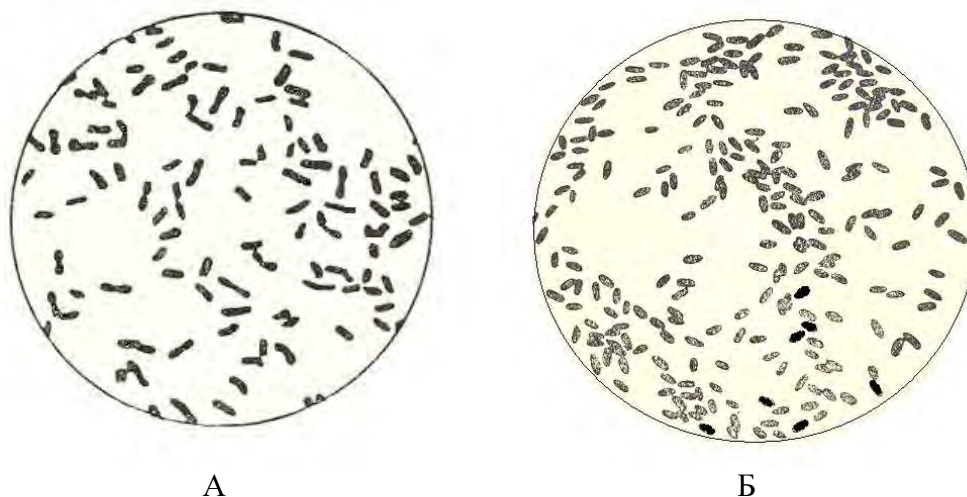


Рис. 33. Нитрифицирующие бактерии : А – Nitrosomonas; Б – Nitrobacter

Вторую фазу нитрификации – окисление азотистой кислоты до азотной – осуществляют представители родов **Nitrobacter, Nitrococcus**. Клетки их более мелкие, овальной или бобовидной формы, грамотрицательные, неподвижные.

Нитрификаторы – это весьма специфичная микрофлора: они являются хемосинтетиками (аноргоксидантами). Энергию для синтеза органических веществ получают за счет реакций окисления аммиака или азотистой кислоты, углерод ассимилируют из углекислого газа воздуха. В лабораторных условиях развиваются только на чисто минеральных средах, не содержащих сложных органических веществ. Нитрификаторы – облигатные аэробы, оптимальная температура развития 28 – 30⁰С, благоприятная рН среды – нейтральная.

Для культивирования нитрифицирующих бактерий готовят питательные среды по С.Н. Виноградскому (на 100 мл дистиллированной воды):

| Для первой фазы | Для второй фазы |
|--|---|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ - 200 мг | NaNO ₂ - 100 мг |
| K ₂ HPO ₄ - 100 мг | K ₂ HPO ₄ - 50 мг |
| MgSO ₄ - 50 мг | MgSO ₄ - 30 мг |
| NaCl - 20 мг | NaCl - 50 мг |
| FeSO ₄ - 40 мг | FeSO ₄ - 40 мг |
| | NaCO ₃ - 100 мг |

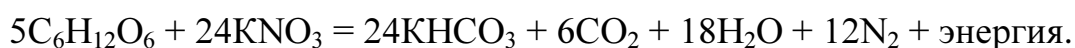
Для приготовления сред необходимо обращать внимание на химическую чистоту реактивов. Важно, чтобы в них не присутствовали в виде примесей нитриты и нитраты.

Смесь тщательно взбалтывают, наливают в колбочку слоем 2-3 см. Для нейтрализации образующихся кислот добавляют 2 г мела, среду в колбе заражают почвой, закрывают рыхлыми ватными пробками и помещают в термостат на две недели.

Из плотных сред для культивирования нитрификаторов используют пластинки кремнекислого геля, а в последнее время более успешно голодный агар, пропитанный средой специального состава.

Процесс денитрификации. Некоторые микроорганизмы используют кислород нитратов для окисления минеральных и органических веществ. В результате происходит восстановление нитратов, и азот переходит в менее окисленную форму. Конечными продуктами восстановления могут быть молекулярный азот, аммиак, нитриты. Процесс восстановления нитратов получил название *денитрификации* или *нитратредукции*.

При восстановлении нитратов денитрифицирующие бактерии получают кислород, которым окисляют органические безазотистые вещества и выделяют необходимую для жизни энергию:



При наличии в среде обитания молекулярного кислорода возбудители денитрификации нормально растут, но азотную кислоту и ее соли не восстанавливают.

Число родов бактерий, представители которых способны к нитратному дыханию, велико (рис. 34). Они распространены в переувлажненных и засоленных, слабоаэрируемых почвах (болотистые, солонцы). Это факультативно-анаэробные хемоорганотрофы родов *Pseudomonas* (*P. denitrificans*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*), *Bacillus*, *Micrococcus* (*M. denitrificans*). Процесс денитрификации могут осуществлять и хемолитотрофные бактерии (*Thiobacillus denitrificans*), для которых нитраты выступают в качестве окислителей неорганических веществ.

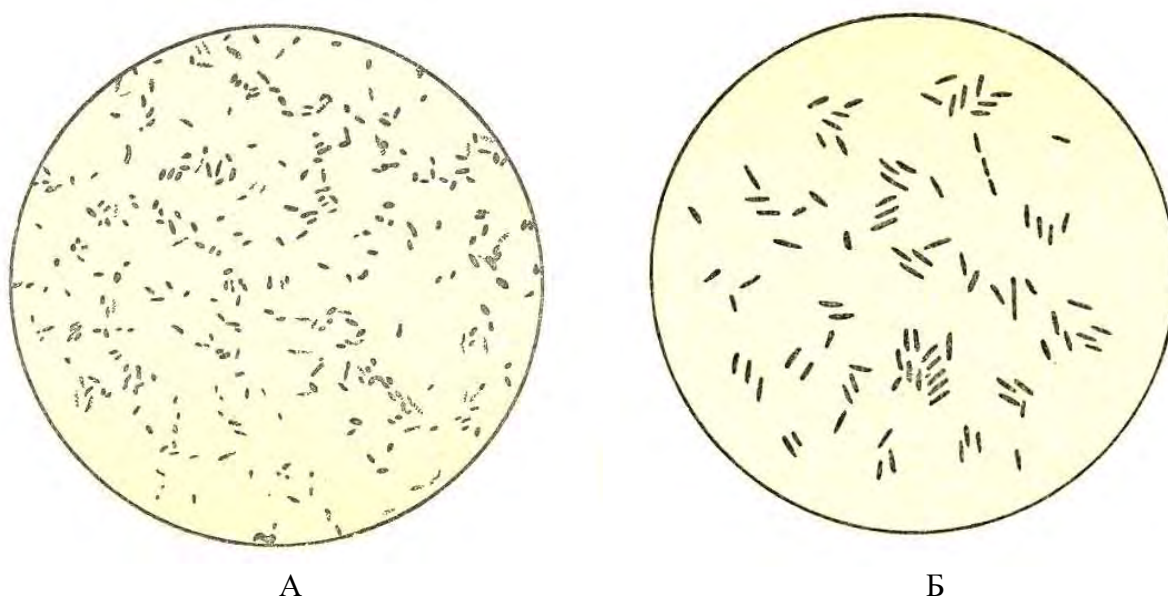


Рис. 34. Денитрифицирующие бактерии:

А – *Pseudomonas denitrificans*; Б – *Pseudomonas pyocyaneum*

Масштабная денитрификация в почве – явление негативное, так как при этом наблюдаются значительные потери минерального азота, и почва теряет свое плодородие. Однако умеренное развитие денитрификаторов, особенно в

ризосфере растений, приносит скорее пользу, чем вред. Денитрифицирующие бактерии – активные продуценты аминокислот, витаминов, регуляторов роста растений, могут оказывать на растительный организм существенное положительное влияние. Благодаря способности продуцировать ценные биологически активные вещества бактерии-денитрификаторы используются человеком в микробиологической и пищевой промышленности.

В условиях лаборатории денитрифицирующую микрофлору культивируют на питательной среде следующего состава (г/л): сегнетова соль – 20; KNO_3 – 2; K_2HPO_4 – 0,5; MgSO_4 – 0,2; водопроводная вода – 1 л.

Среду разливают в высокие пробирки почти до пробки. В последнюю вставляют газоотводную трубку. В пробирки вносят комочек почвы (для создания анаэробных условий поверхность жидкости в пробирках покрывают тонким слоем вазелинового масла), закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре 35°C на 7 дней.

К элективным условиям, обеспечивающим накопление этих бактерий, следует отнести: наличие органического вещества в качестве источника энергии, нитратов – источника азота и кислорода, анаэробные условия – за счет высокого слоя воды и пленки масла.

При анализе культуры отмечают помутнение среды, образование пены в результате развития микроорганизмов и выделения газов CO_2 и N_2 . Газы можно собрать в пробирку и анализировать на CO_2 с помощью поглощения кусочками едкой щелочи, а на азот – с помощью горящей лучинки, которая при выделении азота гаснет. За ходом восстановления нитратов следят по исчезновению азотной кислоты – реакция с дифениламином.

Самостоятельная работа

1. Исследование элективной культуры нитрифицирующих бактерий на жидкой среде Виноградского.
2. Изучение элективной культуры денитрифицирующих бактерий.
3. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование культуры нитрификаторов на минеральной среде Виноградского.

Накопительную культуру нитрифицирующих бактерий 1-й и 2-й фазы подвергают микроскопическому исследованию. Для этого из жидкости берут небольшую капельку бактериологической петлей и, распределив ее по предметному стеклу, окрашивают (после сушки и фиксации) фуксином. В поле зрения микроскопа обнаруживаются палочковидные микроорганизмы мелких размеров (овальные клетки нитрозных бактерий или маленькие палочки нитратных бактерий). Нитрифицирующие бактерии не имеют спор и капсул. Грамотрицательные, подвижные (монотрихи), аэробы. Отличаются расположением клеток и подвижностью.

В культурной жидкости 1 фазы нитрификации определяют наличие азотистой кислоты и аммиака. Наличие азотистой кислоты определяется с помощью *реактива Грисса*, который состоит из двух компонентов – сульфаниловой и нафтиламиновой кислот. В пробирку наливают по 0,5 мл обеих кислот, прибавляют 5 мл исследуемого раствора и кипятят. В присутствии азотистой кислоты появляется красное окрашивание.

Реакцию на аммиак проводят с *реактивом Несслера*. В фарфоровую чашечку вносят 2 – 3 капли реактива Несслера и с края опускают 2 – 3 капли исследуемой жидкости. В присутствии аммиака получается желто–оранжевое окрашивание, а при избытке его – коричневый цвет.

В культуральной жидкости 2 фазы нитрификации определяют наличие азотной кислоты. Реактивом на азотную кислоту служит дифениламин в растворе крепкой серной кислоты. Каплю крепкой серной кислоты вливают в фарфоровую чашечку, прибавляют к ней кристаллик дифениламина и после его растворения сбоку каплю исследуемой жидкости. В присутствии азотной кислоты появляется темно–синее окрашивание.

Работа 2. Изучение элективной культуры денитрифицирующих бактерий.

Для исследования возбудителей готовят окрашенный препарат. При этом жидкость из пробирки сливают, а для мазка используют оставшуюся густую массу. Под микроскопом можно увидеть мелкие палочки денитрифицирующих бактерий. В культуре с винной кислотой в качестве источника углерода обычно преобладает *Pseudomonas stutzeri*, а с лимонной кислотой - *Pseudomonas putrescens*. Все это *неспорообразующие бактерии, подвижные, грамотрицательные, факультативные анаэробы*.

В протоколе исследования следует зарисовать возбудителей изучаемых процессов, дать им краткую характеристику и описать значение их в природе и жизни человека.

Контрольные вопросы

1. Что такое нитрификация, какое значение имеет этот процесс в природе?
2. Назовите возбудителей процесса нитрификации, дайте им краткую характеристику.
3. Опишите методику получения элективной культуры нитрификаторов.
4. Что такое денитрификация, какое значение имеет этот процесс в природе и жизни человека?
5. Дайте характеристику возбудителям процесса денитрификации.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 106, 117 – 119.
2. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 86 – 91.

Занятие 17. Азотфиксирующие бактерии

Цель занятия. Изучение процесса биологической фиксации молекулярного азота и его возбудителей.

План занятия. 1. Знакомство со свободноживущими азотфиксирующими бактериями.

2. Изучение симбиотических азотфиксирующих микроорганизмов.

3. Знакомство с ассоциативными азотфиксирующими бактериями.

4. Самостоятельная работа: изучение накопительных культур свободноживущих азотфиксирующих бактерий, описание характера их роста, приготовление фиксированных препаратов, микроскопия и зарисовка морфологии возбудителей; исследование под микроскопом клубеньковых бактерий с последующей зарисовкой и кратким описанием; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы. Колбы Эрленмейера с культурой азотобактера на жидкой среде. Микроскопы. Микробиологические петли. Фуксин основной в капельницах. Предметные стекла. Чашки сливные с мостиками. Вода для промывки мазков. Масло иммерсионное. Постоянные препараты клубеньковых бактерий. Коллекция бактериальных удобрений. Таблицы: свободноживущие азотфиксаторы, симбиотические азотфиксаторы.

Пояснения к занятию

Процесс биологической фиксации азота воздуха микроорганизмами

Для поддержания благоприятного азотного баланса в почве и улучшения азотного питания растений процесс биологического связывания азота атмосферы микроорганизмами – *азотфиксация* – имеет исключительное значение.

Потеря почвой азота происходит за счет вымывания его в нижние горизонты и улетучивания аммиака и газообразного азота в результате процессов денитрификации. Растения в процессе роста и развития потребляют из почвы много азота. Однако ни высшие растения, ни животные не могут ассимилировать свободный азот атмосферы самостоятельно. Способностью потреблять молекулярный азот обладают только некоторые микроорганизмы, получившие название азотфиксирующих, именно им и принадлежит особо важная роль в обогащении почвы связанным азотом.

Бактерии-азотфиксаторы используют молекулярный азот для синтеза клеточных белков. После отмирания клеток азотфиксаторов и последующей аммонификации их белков в почве увеличивается содержание минерального азота. При жизни азотфиксаторы также способны выделять из своих клеток в окружающую среду азотистые вещества (аммиак, аминокислоты).

Азотфиксирующие микроорганизмы принято подразделять на свободноживущие и симбиотические. Последние вступают в симбиотические отношения с высшими растениями и только в условиях симбиоза способны фиксировать атмосферный азот.

Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы

Наиболее важными и хорошо изученными свободноживущими азотфиксаторами являются бактерии из родов ***Azotobacter*** и ***Clostridium***.

Азотобактер распространен в почвах, богатых легко доступным органическим веществом, имеющих нейтральную или слабощелочную реакцию среды.

Морфология клеток и колоний азотобактера позволяет различать его среди других почвенных микроорганизмов.

В молодой культуре клетки азотобактера имеют вид крупных (3 x 6 мкм) одиночных или соединенных попарно подвижных палочек с закругленными концами. С возрастом палочки постепенно укорачиваются и превращаются в крупные (до 5 – 6 мкм в диаметре) кокки, напоминающие (в случае попарного соединения) восьмерки. При этом клетки покрываются толстой слизистой капсулой, теряют подвижность и начинают активно выделять темно-коричневый пигмент (рис. 35).

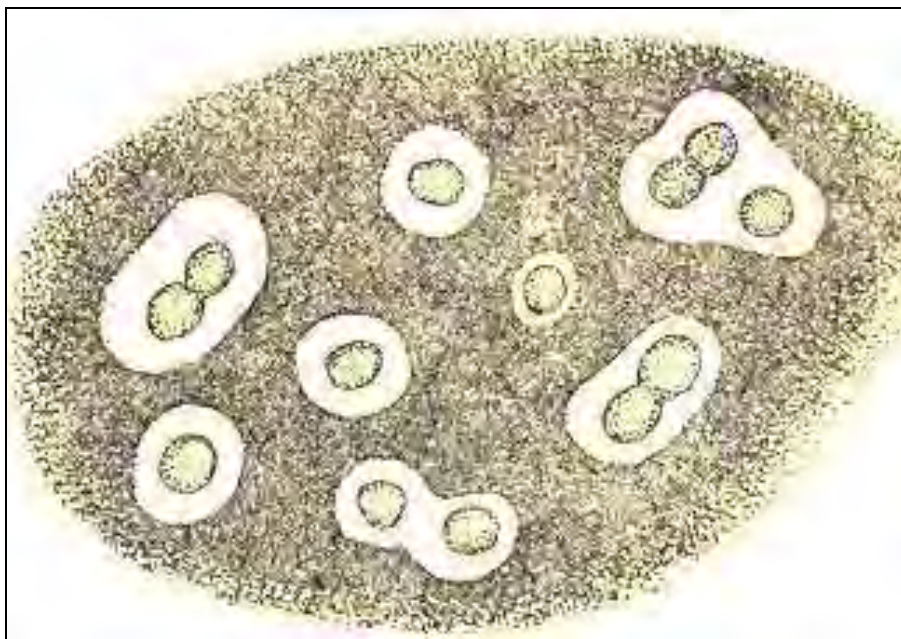


Рис. 35. *Azotobacter chroococcum*: клетки с капсулами в капле туши

На плотных безазотных средах колонии азотобактера растут в виде бесцветных густослизистых выпуклых капель (или растекающегося налета), которые по мере старения приобретают бурый или почти черный цвет. Такая окраска колоний характерна для наиболее распространенного в почве вида *Azotobacter chroococcum*. Другой вид – *Az. vinelandii* – на плотных средах образует колонии желто-зеленого флуоресцирующего цвета.

Источником азота для азотобактера служит молекулярный азот, но этот микроорганизм может также усваивать азот нитратов, солей аммония, аминокислот. Углерод и энергию азотобактер получает из разнообразных органических веществ: углеводов, спиртов, органических кислот и их солей. Азотобактер требователен к наличию в среде фосфора, кальция и железа, а также микроэлементов – молибдена, бора.

Азотобактер строгий аэроб. Температурный оптимум роста его 28 – 30⁰С, рН среды нейтральная или слабощелочная.

Экологи и почвенные микробиологи используют этот микроорганизм для индикации уровня почвенного плодородия, степени окультуренности почвы,

обнаружения в почве различных токсикантов (пестицидов и др.). На основе клеток азотобактера готовят бактериальное удобрение – *азотобактерин*.

Для обнаружения и количественного учета азотобактера применяют безазотистые питательные среды Эшби и Федорова, а также почвенные пластинки. Метод почвенных пластинок (по Мишустину) заключается в следующем: 50 г почвы помещают в фарфоровую чашку, добавляют 0,5 г маннита (можно сахарного песка), 50 мг K_2HPO_4 (или двойного суперфосфата), 1 г мела, увлажняют до пастообразного состояния, тщательно перемешивают, переносят в чашку Петри и металлическим стерильным шпателем делают гладкую поверхность. Для лучшей аэрации на дно чашки следует помещать дренаж - древесный уголь или битое стекло. Чашки ставят в эксикатор, на дно которого налита вода (влажная камера), и помещают в термостат. Через 6 дней на поверхности почвенной пластинки появляются колонии азотобактера.

На плотных средах (агар Эшби и др.) вместе с азотобактером развиваются и другие микроорганизмы, так называемые олигонитрофилы. Развитие их происходит либо за счет атмосферного азота, который они фиксируют в небольших количествах, либо за счет его следов, содержащихся в питательной среде. В отличие от азотобактера эти микроорганизмы образуют мелкие, в основном бесцветные колонии.

К свободноживущим азотфиксаторам относится ряд спорообразующих бактерий рода *Clostridium*. Среди них маслянокислые (*Cl. pasteurianum*), ацетонобутиловые (*Cl. acetobutylicum*), пектинразлагающие (*Cl. pectinovorum*). В определенных условиях эти бактерии могут фиксировать молекулярный азот.

Подобно азотобактеру, *Cl. pasteurianum* использует различные источники углерода, энергию получает за счет сбраживания этих веществ. На безазотистых средах эти бактерии фиксируют молекулярный азот, но они могут усваивать также азот из различных минеральных и органических соединений. Обнаружение в почве и количественный учет *Cl. pasteurianum* производят на безазотистой среде Виноградского методом предельных разведений.

Симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы

Важная роль в фиксации атмосферного азота принадлежит клубеньковым бактериям – симбиотическим азотфиксаторам, поселяющимся в корнях бобовых культур. Клубеньковые бактерии (*Rhizobium*) – палочковидная микрофлора, небольших размеров (1 – 2 мкм), первоначально прямые или слегка изогнутые, подвижные, спор и капсул не образуют, по Граму окрашиваются отрицательно, аэробы.

В жизненном цикле клубеньковых бактерий условно можно выделить две стадии: вегетативную и симбиотическую. На первой стадии (в почве) они существуют как обычные сапротрофные микроорганизмы. Совершенно иной «образ жизни» ризобии ведут при взаимодействии с бобовым растением. В фазу бутонизации и цветения бобового растения палочки ветвятся, теряют подвижность, приобретают вид вилочек и называются бактериоидами, к осени они имеют вид опоясывающих палочек, распадающихся затем на кокки. Эти бакте-

рии обычно приурочены к ризосферной почве бобовых растений, с которыми они вступают в симбиоз. Внешним проявлением этого сожительства является образование клубеньков на корнях бобовых растений. Клубеньки представляют собой разросшуюся ткань корня, заполненную бактериями (бактериодная ткань). Клубеньки служат центрами азотфиксации (рис. 36).

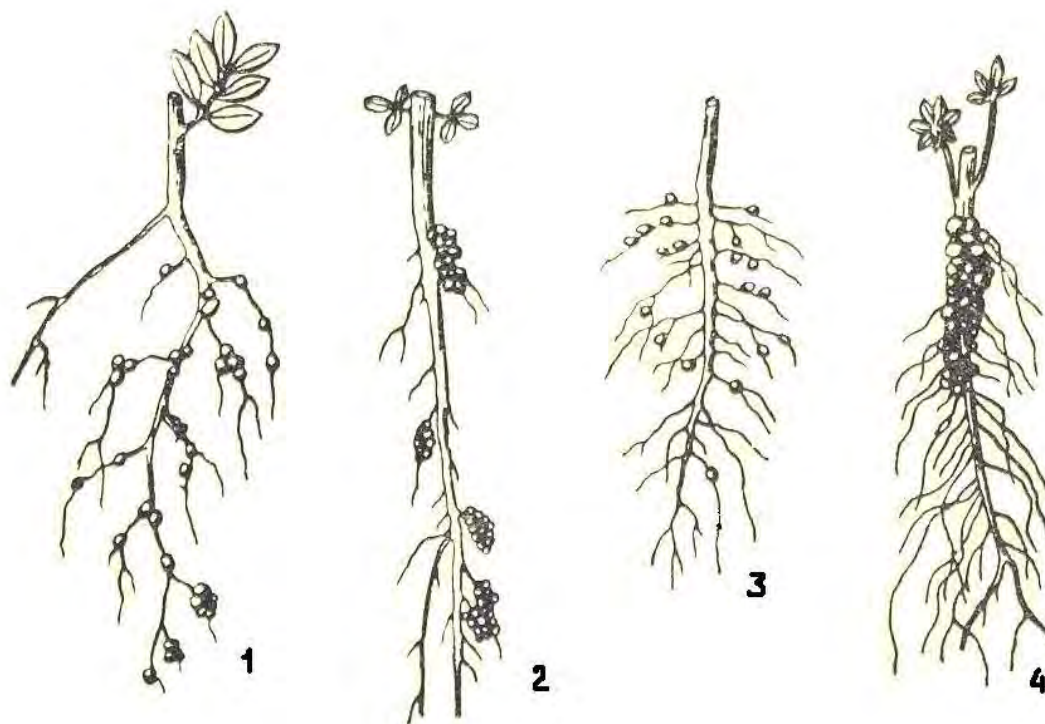


Рис. 36. Клубеньки на корнях бобовых растений:
1 – люпина, 2 – люцерны, 3 – фасоли, 4 – вики

Клубеньковые бактерии характеризуются строгой специфичностью, вступая в симбиоз только с определенным видом (иногда даже сортом) бобового растения.

На основе клубеньковых бактерий готовят бактериальное удобрение *нитрагин* (*ризобин*). Вносят его исключительно под бобовые культуры.

Для культивирования клубеньковых бактерий применяют натуральные и синтетические среды. Оптимальной средой, обеспечивающей хороший рост многих видов клубеньковых бактерий, является маннитно-дрожжевая среда. На питательном агаре клубеньковые бактерии формируют на 5 – 7 день клейстерообразные беловатые или бесцветные колонии.

Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы

Установлено, что кроме давно известных нескольких микроорганизмов-азотфиксаторов (представителей родов *Azotobacter*, *Clostridium* и цианобактерий) большое количество свободноживущих почвенных микроорганизмов способно фиксировать атмосферный азот. Многие из них можно встретить в ризосфере и ризоплане растений: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* и *Aquaspirillum*.

В отличие от классических форм азотфиксаторов, для исследования которых используют селективные безазотистые среды, указанные организмы нуждаются в весьма специфичных условиях выращивания для выявления их азотфиксирующей активности.

Основное свойство этих азотфиксаторов – потребность в микроаэрофильных условиях для осуществления фиксации азота.

Необходимые условия для развития микроаэрофильных ассоциативных азотфиксаторов могут быть созданы как путем затруднения диффузии кислорода при использовании полужидких сред, так и путем посева на среды «со стартовым азотом». В последнем случае культуры азотфиксаторов начинают расти за счет минерального азота среды, поглощают избыток кислорода и создают в окружающей среде низкое парциальное давление кислорода. Оптимальные условия для азотфиксации нередко создаются в совместных культурах азотфиксаторов с другими микроорганизмами, обеспечивающими их витаминами, доступными источниками углерода и создающими благоприятные окислительно-восстановительные условия в окружающей среде.

Учет количества азотфиксирующих ассоциаций в почве проводят на глюкозо-автолизатной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10; дрожжевой автолизат – 0,1; K_2HPO_4 – 1,74; KH_2PO_4 – 0,91; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,03; NaCl – 0,5; $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$ – 0,1; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ – 0,01; смесь микроэлементов по Федорову (1 мл); бромтимолблау – 0,01 – 0,02; вода дистиллированная.

Состав микроэлементов (г/л): H_3BO_3 – 5,0; $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ – 5,0; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 3,0; KI – 0,5; NaBr – 0,5; $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,2; $Al_2(SO_4)_3 \cdot 12 H_2O$ – 0,3.

По 30 мл этой среды разливают в конические колбы вместимостью 100 мл. Для инокуляции используют 1 мл почвенной суспензии в разведениях от $1:10^2$ до $1:10^7$. Высевы из каждого разведения проводят в трехкратной повторности. Инкубацию культур ведут при $28 - 30^{\circ}C$ в течение 4 – 5 недель. Обычно опыт прекращают после полного потребления глюкозы. При сильном подкислении среды в процессе инкубации (желтая окраска бромтимолблау) ее нейтрализуют стерильным раствором 0,2 н. NaOH. В конце опыта во всех вариантах, где отмечен заметный рост, определяют азот по методу Кьельдаля. Исходное содержание азота в 30 мл среды обычно составляет 0,6 – 0,7 мг, и прибавки, равные 0,3 мг азота и более, рассматриваются как показатели азотфиксации в данном варианте.

На этой среде развиваются *Bacillus polymyxa*, *Xanthobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*. Клостридии и азотобактер на данной среде не развиваются.

Самостоятельная работа

1. Исследование элективной культуры свободноживущих азотфиксирующих бактерий на жидкой безазотной среде.
2. Изучение клубеньковых бактерий, знакомство с коллекцией бактериальных удобрений.
3. Исследование накопительной культуры ассоциативных азотфиксаторов.
4. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование элективной культуры свободноживущих азотфиксирующих бактерий.

Свободноживущие азотфиксаторы культивируют на безазотистой среде следующего состава: водопроводная вода – 100 мл; маннит - 2 г; K_2HPO_4 - 20 мг; $CaCO_3$ - 500 мг.

Приготовленную среду наливают не стерилизуя в конические колбы объемом 100 мл слоем 2 – 3 см, вносят комочек почвы, закрывают и ставят в термостат на несколько дней. На 6 – 7 сутки на поверхности среды образуется пленка, вначале серовато-белая, а затем коричневато-бурая. При микроскопировании пленки обнаруживаются клетки азотобактера в виде крупных кокков и диплококков, часто с капсулой. По Граму окрашиваются положительно (студенты красят препарат фуксином).

Элективными условиями для азотобактера являются аэрация, отсутствие в питательной среде азота и присутствие в среде фосфора и кальция, к которым требователен азотобактер.

Нередко в колбах наблюдается вспенивание жидкости и появление запаха масляной кислоты, что свидетельствует о развитии на дне колбы (в анаэробных условиях) бактерий *Clostridium pasteurianum*. При наличии времени студенты могут убедиться в присутствии возбудителей маслянокислого брожения, приготовив препарат «раздавленная капля» из нижних слоев жидкости с добавлением раствора Люголя. Микроскопируют препарат с объективом 40^x.

Работа 2. Знакомство с клубеньковыми бактериями и коллекцией бактериальных удобрений.

Клубеньковые бактерии изучаются в готовых препаратах, приготовленных из клубеньков гороха. Микроскопируют мазок с масляной иммерсией. Необходимо выявить на препарате опоясанные палочки и бактериоиды – разветвленные клетки в форме вилок или буквы «т».

Дополнительно студенты изучают коллекцию бактериальных удобрений (агаровый нитрагин, ризобин, ризоторфин, азотобактерин) и условия их правильного применения для повышения плодородия почвы и продуктивности растений.

Работа 3. Исследование накопительной культуры ассоциативных азотфиксаторов.

Выявление ассоциативного азотфиксатора *Bacillus polymyxa* проводят на среде с картофелем и мелом следующего состава (г/л): сахароза – 10; K_2HPO_4 – 1,74; KH_2PO_4 – 0,91; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3; NaCl- 0,5; $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$ – 0,1; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ – 0,01. Вода дистиллированная. На дно пробирок помещают щепотку мела и мелко нарезанные ломтики картофеля. Жидкую среду разливают в пробирки слоем 10 – 12 см. Образование газа, служащее показателем развития бактерий, определяют на 2, 3 и 5-й день.

Указанная среда благоприятна и для роста *Clostridium*. Разграничение этих двух групп проводят путем микроскопического исследования. При добавлении

к препарату раствора йода клетки *Bac. polymyxa* в отличие от *Clostridium* не дают синего окрашивания.

Выделять *Bac. polymyxa* из накопительных культур можно путем высева содержимого пробирок, пастеризованных нагреванием при 80⁰С в течение 10 мин, на чашки с картофельным агаром с последующей аэробной инкубацией.

В протоколе исследования необходимо зарисовать все фазы развития клубеньковых бактерий, морфологию клеток азотобактера, дать им краткую характеристику, описать значение процесса биологической фиксации азота в природе.

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеет биологическая фиксация азота в природе?
2. Назовите свободноживущих азотфиксирующих бактерий, дайте им краткую характеристику.
3. Назовите симбиотических азотфиксаторов, охарактеризуйте их биоэкологические особенности.
4. Какие бактериальные удобрения на основе свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов Вы знаете?

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 123 – 124.
2. Теплер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – С. 91 - 98.

Занятие 18

Преобразования микроорганизмами соединений фосфора, серы и железа в природе

Цель занятия. Изучение микрофлоры, участвующей в трансформации минеральных и органических соединений фосфора, серы и железа.

План занятия. 1. Знакомство с бактериями-фосфоромобилизаторами.

2. Изучение микроорганизмов, участвующих в круговороте серы.

3. Знакомство с железобактериями.

4. Самостоятельная работа: изучение фосфорных бактерий на постоянных препаратах, демонстрационных культур фосфоромобилизаторов на чашках Петри, исследование накопительных культур возбудителей процесса сульфификации и сульфатредуцирующих бактерий, железобактерий, приготовление фиксированных препаратов, микроскопия и зарисовка морфологии возбудителей; оформление протокола исследования.

Оборудование и материалы: постоянные препараты фосфорных бактерий, демонстрационные чашки Петри с культурами фосфоромобилизаторов, накопительные культуры серобактерий и железобактерий. Микроскопы. Масло иммерсионное. Вата в баночках. Микробиологические петли. Фуксин основной в капельницах. Предметные стекла. Чашки сливные с мостиками. Вода для промывки мазков. Тетради для высушивания мазков. Таблицы: фосфорные бактерии, серобактерии, железобактерии.

Пояснения к занятию

Превращения фосфора в природе

В почве фосфор содержится в органической и минеральной формах, малодоступных для растений. Микроорганизмы способны минерализовать органический фосфор. Конечным продуктом этого процесса является фосфорная кислота.

Схематически этот процесс можно изобразить так:

I. Нуклеопротеид → нуклеин → нуклеиновая кислота → нуклеотиды → фосфорная кислота.

II. Лецитин → глицерофосфорные эфиры → фосфорная кислота.

Наиболее активным разрушителем органофосфатов является *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, представляющий собой крупную спорообразующую палочку (4 – 5 мкм в длину), подвижную, грамположительную (рис. 37). Для выращивания этих бактерий используют среду Р. А. Менкиной (г/л): нуклеиновая кислота или лецитин – 5, мел – 20, агар – 30, 1000 мл МПБ. Нуклеиновую кислоту вносят растворенной в этиловом спирте.

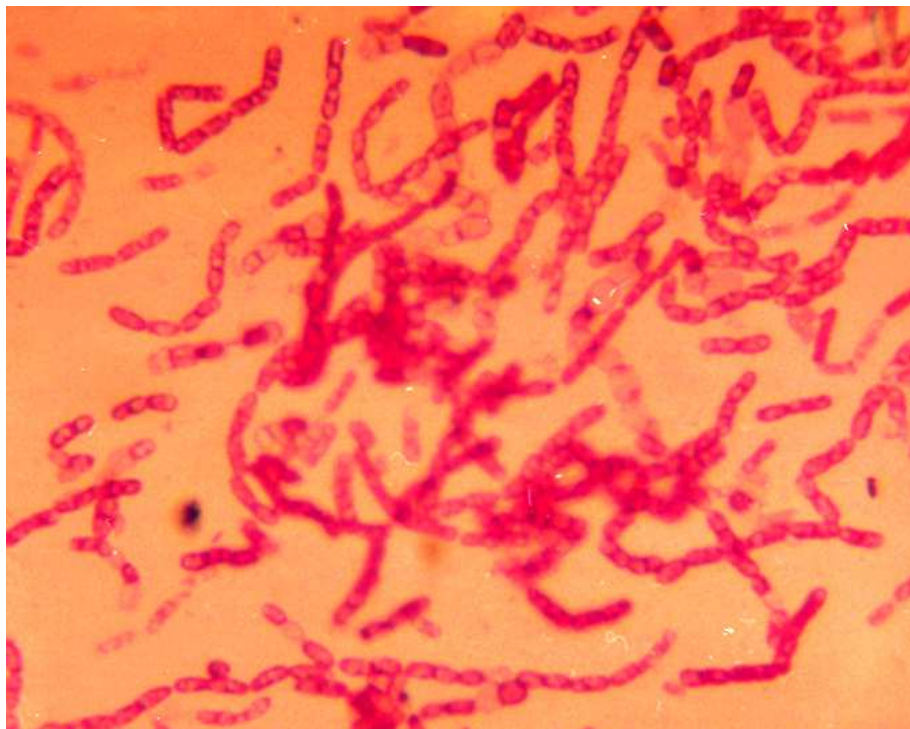


Рис. 37. Фосфорные бациллы. Об. 90, ок. 10. Оригинал

Если в почве присутствуют бактерии, выделяющие фосфатазу, они развиваются на этой среде и отщепляют фосфорную кислоту, образуя вокруг колоний зону растворения мела.

Минеральные соединения фосфора, например, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, также недоступны для высших растений. Однако в почве существует немало микроорганизмов, выделяющих в окружающую среду в процессе метаболизма органические и минеральные кислоты, способные растворять фосфаты кальция и мобилизовать фосфор. Этот процесс, например, под влиянием нитрифицирующих бакте-

рий, происходит по следующей схеме: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 4 \text{HNO}_3 \rightarrow \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + 2\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Для наблюдения за этим процессом готовят почвенный экстракт с 2% глюкозы и 2% агар-агара. Расплавленную среду разливают в чашки Петри, на дно которых насыпают 0,1 – 0,2 г $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, все равномерно размешивают. После застывания среды в чашки раскладывают комочки почвы и помещают посеы в термостат при температуре 25 – 30⁰С. Если в почве содержатся кислотообразующие микроорганизмы, то через неделю вокруг почвенных комочков становятся хорошо видными прозрачные зоны, возникающие за счет растворения фосфатов.

Круговорот серы в биосфере

Сера наряду с фосфором является одним из биогенных элементов. Она входит в состав белков, некоторых аминокислот и витаминов, важных для жизнедеятельности клеток. Основная масса серы попадает в почву вместе с растительными и животными остатками. Входя в состав белков, в процессе их аммонификации она выделяется в основном в виде сероводорода. Помимо распада белков сероводород возникает при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот. Этот процесс носит название *десульфификации*.

Сероводород ядовит для растений, но его накопление в почве обычно не наблюдается вследствие широко идущего окисления сероводорода в серную кислоту. Этот процесс получил название *сульфофикации*.

Процесс сульфификации контролируется серобактериями. Это микроорганизмы, способные усваивать углерод из углекислоты как в процессе хемосинтеза, так и фотосинтеза. Серобактерии играют полезную роль в жизни почвы и водоемов. Они освобождают среду от токсичного для растений и животных сероводорода, обогащают ее сульфатами, способствуют нейтрализации щелочных карбонатных почв.

Серобактерии подразделяются на три основные группы: тионовые, пигментные и нитчатые.

Тионовые бактерии – мелкие одиночные палочки, которые при окислении сероводорода не откладывают серы в клетке, являются облигатными хемолитотрофами. Тионовые бактерии широко распространены в водоемах и почвах, а также в разрушающихся горных породах. Им принадлежит ведущая роль в окислении неорганических соединений серы. Представителями тионовых бактерий являются *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus* и др. Большинство тионовых бактерий развивается только при наличии кислорода.

Пигментные бактерии или цветные серобактерии (фотосинтезирующие). К ним относятся пурпурные (сем. *Chromatiaceae*) и зеленые (сем. *Chlorobiaceae*) бактерии, имеющие хлорофилл. Это грамотрицательные микроорганизмы, отличающиеся морфологией клеток (сферические, палочковидные и извитые формы). Фотосинтез протекает в анаэробных условиях и не сопровождается выделением кислорода, а донором водорода для восстановления CO_2 служит сероводород. Эти организмы фотолитотрофы. В подвижных клетках серобактерий видны включения серы. Для получения накопительной культуры фотосинтезирующих серобактерий используют среду Ван–Ниля.

Нитчатые серобактерии – свободно плавающие длинные нити (*Beggiatoa*), неподвижные нити (*Thiothrix*), многоклеточные нити (*Thioploca*). Все они окисляют сероводород до элементарной серы, которая временно откладывается внутри клеток или на поверхности в виде капель. По типу углеводородного питания – миксотрофы. За счет энергии окисления водорода они могут ассимилировать CO_2 , но одновременно нуждаются и в органических соединениях.

Для получения культуры серобактерий С.Н.Виноградский рекомендует на дно высокого цилиндра бросить немного ила, гипса, остатки водных растений и доверху залить водой. Примерно через месяц на поверхности возникает серовато-бурая хрупкая пленка, состоящая из крупных нитей серобактерий с отложениями капельно-жидкой серы.

Серу могут окислять многие хемоорганотрофные микроорганизмы (бациллы, псевдомонады, актиномицеты и грибы). Они окисляют серу в присутствии органических веществ, но этот процесс в природе идет слабо.

Процесс восстановления соединений минеральной серы до сероводорода получил название *сульфатредукции* или десульфофикации. Он происходит в анаэробных условиях - в плохо аэрируемых и затопляемых почвах и водоемах (лиманах).

Бактерии, вызывающие восстановление сульфатов, подразделяются на неспорообразующие (*Desulphovibrio*) и спорообразующие (*Desulphotomaculum*). Первые – изогнутые палочки, отличаются большой подвижностью, облигатные анаэробы. Донором водорода для них служит пируват и малат. Вторые – прямые или изогнутые палочки, перитрихи, имеют споры. В качестве доноров водорода используют пировиноградную и молочную кислоты.

Для получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий применяют среду Постгейта:

Раствор I (г): K_2HPO_4 – 1; NH_4Cl – 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2; лактат Na (70%-й раствор) – 3,5 мл; дрожжевой экстракт – 1 мл; вода дистиллированная – 980 мл; pH 7,4.

Раствор II (г): $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5; вода дистиллированная – 10 мл.

Раствор III (г): аскорбиновая кислота – 0,1; Na-тиогликолят – 0,1; вода дистиллированная – 10 мл; pH 7,4.

Растворы стерилизуют отдельно, затем их сливают и распределяют смесь по стерильным пробиркам до самого верха. Инокулируют почвой или илом. Пробирки закрывают резиновыми пробками и заливают парафином или обмазывают пластилином. Инкубируют в течение 20 дней при 30°C .

Развитие сульфатредуцирующих бактерий сопровождается почернением осадка и самой жидкости в пробирках вследствие образования сернистого железа. При вскрытии пробирок ощущается выраженный запах сероводорода.

Молекулярную серу могут восстанавливать до сероводорода многие термоацидофильные облигатно анаэробные бактерии, которые сосредотачиваются в горячих и кислых источниках и почвах вулканического происхождения.

Превращения железа в природе

Железо относится к числу необходимых элементов для органической жизни, и растения на почвах, лишенных этого элемента, развиваются очень плохо. Часто у растений, испытывающих острый дефицит железа, развивается такое заболевание, как хлороз листьев. В такой же мере необходимо железо и для развития многих микроорганизмов.

Минерализация органических железосодержащих соединений осуществляется гетеротрофными бактериями. При этом освобождается минеральное окисное или закисное железо. Превращение неорганических соединений железа в природе осуществляется специализированной группой микроорганизмов – железобактериями. Это в основном нитчатые формы, состоящие из цепочек палочковидных клеток, окруженных влагалищем, заполненным гидроксидом железа. К типичным железобактериям относят роды *Leptotrix*, *Crenotrix*, *Gallionella* и некоторых представителей почкующихся бактерий. Грамотрицательные, аэробные бактерии (рис. 38), типичные обитатели водоемов, но часто встречаются и в заболоченных почвах. В железистых источниках – ручьях и болотах - они образуют большие скопления гидрата окиси железа, так называемой болотной руды (лимонит). Их считают литогетеротрофами или хемоавтотрофами. Все они принимают участие в отложении охристых осадков, формировании глеевого горизонта некоторых почв. Одноклеточные бактерии могут окислять не только железо, но и марганец.

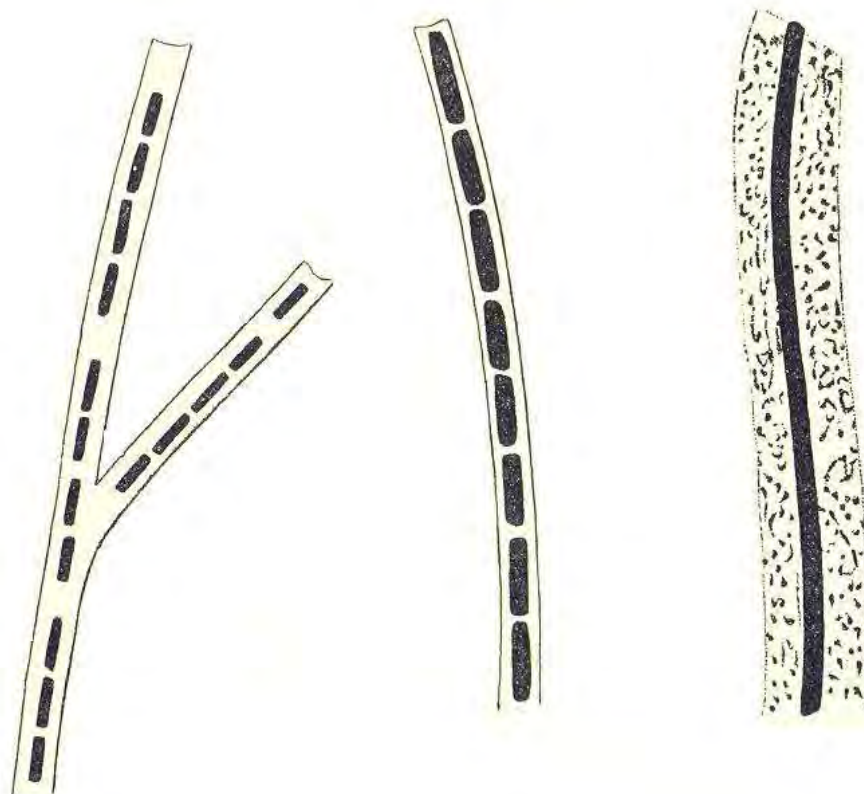


Рис. 38. Железобактерии: слева направо – *Cladothrix*, *Crenothrix*, *Chlamydothrix*

Для выделения и культивирования железобактерий применяют элективные минеральные среды, содержащие соли железа – Лиске, Виноградского и др.

Среда Лиске для *Gallionella* имеет следующий состав (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,5; K_2HPO_4 – 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; KCl – 1,05; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; вода дистиллированная.

Среду Лиске разливают тонким слоем в колбочки и стерилизуют при 1,5 атм. Отдельно стерилизуют измельченную железную проволоку. Перед посевом ее вносят в колбочки (примерно 50 мг на 1 колбочку) и засевают почвенной суспензией. Культивирование лучше проводить при 10°C . На данной среде автотрофные бактерии рода *Gallionella* образуют на дне колбочки охряные хлопья.

Самостоятельная работа

1. Исследование бактерий-фосфоромобилизаторов.
2. Изучение элективной культуры фотосинтезирующих серобактерий.
3. Исследование накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий.
4. Изучение элективной культуры железобактерий.
5. Оформление протокола исследования.

Методические указания

Работа 1. Исследование бактерий-фосфоромобилизаторов.

Морфологию фосфорного бацилла (основа бактериального удобрения фосфоробактерина) студенты изучают на постоянных препаратах под микроскопом с масляноиммерсионной системой. С работой бактерий-фосфоромобилизаторов знакомятся на демонстрационных чашках Петри (заранее закладывает к занятию лаборант).

Работа 2. Изучение накопительной культуры пурпурных серобактерий.

В высокий цилиндр наливают водопроводной воды, прибавляют небольшое количество ила и круто сваренное яйцо, очищенное от скорлупы. Цилиндр закрывают сверху куском марли и ставят на яркий солнечный свет или под электрическую лампочку 60 ватт на расстояние 30 – 40 см. Через некоторое время в воде развиваются различные микроорганизмы, в том числе зеленые водоросли, отчего вода зеленеет. Через 1 – 2 месяца внутренняя поверхность цилиндра покрывается кроваво-красными пятнами благодаря развитию пигментированных серобактерий.

Для микроскопического исследования соскабливают красный налет, готовят фиксированный и окрашенный препарат. На препарате можно видеть овальные крупные клетки *Chromatium*.

Работа 3. Исследование культуры сульфатредуцирующих бактерий.

Стерильной пипеткой из глубоких слоев жидкости в пробирках отбирают немного материала и каплю культуры помещают на предметное стекло. Готовят фиксированный и окрашенный фуксином препарат, микроскопируют его с иммерсионной системой.

Работа 4. Изучение элективной культуры железобактерий.

Для получения культуры железобактерий по методике Виноградского в высокий цилиндр вносят хорошо вываренное сено (можно опавшие листья),

свежеосажденный гидрат окиси железа и небольшое количество ила, а затем заливают водопроводной водой. При комнатной температуре через месяц на стенках сосуда появляются темно-бурые пятна, состоящие из скоплений железобактерий. Из них студенты готовят препараты на стекле, окрашивают фуксином и микроскопируют с иммерсионной системой.

В протоколе исследования необходимо зарисовать клетки фосфорного бацилла и внешний вид демонстрационной чашки с посевами бактерий-фосфоромобилизаторов; выполнить рисунок пурпурных, тионовых и бесцветных нитчатых серобактерий, описать методику постановки культуры сульфатредуцирующих бактерий, характер их роста; зарисовать нитчатые формы железобактерий, кратко охарактеризовать значение изученной микрофлоры в природе.

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеют микроорганизмы-фосфоромобилизаторы в природе?
2. Охарактеризуйте микрофлору, участвующую в круговороте серы.
3. Назовите железобактерии, дайте им краткую характеристику.

Список литературы

1. Градова Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2004. – С. 124 – 125.
 2. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. - С. 100 - 110.
-

Список литературы

1. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность, 1979.
2. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989.
3. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. – М.: Изд-во АН СССР, 1952.
4. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. – Л.: Колос, 1969.
5. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1989.
6. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. – М.: Книжный дом «Университет», 2001.
7. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. – М.: Изд-во МГУ, 1985.
8. Колешко О.И. Экология микроорганизмов почвы: Лабораторный практикум. – Мн.: Выш. школа, 1981.
9. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1989.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991.
11. Методы экспериментальной микологии: Справочник. – Киев: Наукова думка, 1982.
12. Новогрудский Д.М. Почвенная микробиология / Под ред. А.А. Имшенецкого. – Алма-Ата: Изд-во АН Казахской ССР, 1956.
13. Определитель бактерий Берджи в 2 томах. 9-е изд. – М.: Мир, 1997.
14. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988.
15. Практикум по систематике растений и грибов / Под ред. А.Г. Еленевского. – М.: Издательский центр «Академия», 2001.
16. Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха: Справочное пособие. – М.: Агропромиздат, 1991.
17. Почвенная микробиология / Под ред. и с предисл. Д.И. Никитина. – М.: Колос, 1979.
18. Протисты / Под ред. А.Ф. Алимова. – М.: Наука, 2000.
19. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983.
20. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Под ред. и с предисл. Г.С. Муромцева. – М.: Колос, 1983.
21. Федоров М.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Госиздательство с. – х. литературы, 1951.
22. Экология микроорганизмов / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004.

Приложение

Микрофотографирование

Специалист-биолог должен в совершенстве владеть техникой фотографии и микрофотографии. Фотография – один из методов познания. По фотографии изучают детали объекта, его особенности. Фотография точно передает то, что видно в поле зрения микроскопа, и является научным документом. Некоторые биологические объекты и явления невозможно воспроизвести повторно. В таких случаях сохранить уникальный препарат можно только с помощью фотографии.

Снимки биологических микрообъектов производят с помощью микроскопа, на котором должна быть установлена микрофотонасадка. Сегодня фотографическая техника шагнула далеко вперед, и микроскопы оборудуют микрофотонасадками с цифровыми фотоаппаратами или веб-камерами, однако специалисту хорошую службу может сослужить и обычная микрофотонасадка с малоформатной фотокамерой типа «Зенит» или «ФЭД». Автор, например, получал хорошие микрофотоснимки с фотонасадкой МФН-12, оборудованной под фотоаппарат «ФЭД» даже в нестабильных по уровню освещенности полевых условиях (рис. 39). Для равномерного освещения поля зрения вогнутое зеркало



Рис. 39. Микрофотонасадка МФН-12 на микроскопе «Биолам» с фотокамерой «ФЭД»

бой микрофотосъемкой тщательно удаляют пыль с микроскопа (!). Если во время

заменилось плоским. Свет должен быть по возможности сильным и наведен по Кёлеру. Такое освещение можно получить в лабораторных условиях с помощью специальных ламп накаливания.

Контраст увеличивают с помощью светофильтров: синих – для черно-белых объектов, зеленых – для красных, оранжевых – для светло-синих.

Для контроля резкости изображения на фотоэмульсионном слое пользуются визирной трубкой. В ней имеется окуляр, объектив и сетка, которая представляет собой стеклянную пластинку с прямоугольной рамкой. В центре рамки помещены биштрихи.

Перед тем как сделать снимок с препарата, необходимо добиться, чтобы сетка и изображение объекта были видны одновременно резко. Перед лю-

микрофотографирования применяют иммерсионный объектив, то иммерсионное масло ни в коем случае не должно содержать посторонних включений и пузырьков воздуха.

В микрофотографии не всегда легко определить выдержку, она зависит от многих причин: источника света, светофильтров, степени увеличения, фотоматериала, плотности объекта. Выдержку определяют путем фотографических проб, делая несколько снимков одного и того же объекта на пленку. Экспозиция каждого кадра должна быть разной – 1, 2, 3 с и т.д.

Качество снимка зависит от качества фотопленки. Лучшие результаты дает мелкозернистая фотопленка с высокой разрешающей способностью. На пленках, предназначенных для бытовой фотографии, не всегда можно получить желаемые результаты. Однако не следует от них отказываться. Цветные пленки «Кодак-Ультра» (ISO 400), «Кодак-Колор-Плюс» (ISO 200), «Коника-Колор VX» (ISO 200, 100) и черно-белые «Фомапан-Классик» (ISO 100) дают возможность получать фотоснимки удовлетворительного и хорошего качества. Использование цветной фотопленки для бытовых целей выгодно тем, что ее после экспонирования можно быстро и недорого обработать (проявить) в специализированных фотосалонах.

Очень важно в микрофотографии определить увеличение изображения. Для этого на столик микроскопа после фотосъемки препарата помещают объект-микрометр, который проектируется на матовое стекло фотокамеры. Объект-микрометр фотографируют при той же комбинации окуляра и объектива, что и снимок, а затем точно измеряют одно деление и переносят на снимок. Можно объект-микрометр не фотографировать, но точно измерить одно его деление на матовом стекле. В обоих случаях после этого необходимо вычислить отношение размера деления объект-микрометра на стекле фотокамеры к действительной его величине. Например, на матовом стекле размер одного деления объект-микрометра равен 5 мм, а в действительности – 0,01 мм. Разделив первое число на второе, получим увеличение изображения – 500.

Учебное издание

ЕВСЕЕВ ВАДИМ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**Лабораторный практикум
по экологии микроорганизмов**

Учебное пособие

Редактор: Н.Л. Попова

Подписано в печать . Формат 60 x 84 1/16 Бумага тип. № 1. Печать трафаретная. Уч.-изд. л.
Заказ Усл. печ. л. 7, 15. Цена свободная Тираж

РИЦ Курганского государственного университета,
640669, Курган, ул. Гоголя, 25,
Курганский государственный университет.