

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СИСТЕМ
УПРАВЛЕНИЯ И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ

Кафедра радиоэлектронных технологий и экологического мониторинга
(РЭТЭМ)

ЭКОЛОГИЯ ОРГАНИЗМОВ

Методические указания к лабораторному практикуму для направления
подготовки 022000.62 – Экология и природопользование

Томск 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

**ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СИСТЕМ
УПРАВЛЕНИЯ И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ
(ТУСУР)**

Кафедра радиоэлектронных технологий и экологического мониторинга
(РЭТЭМ)

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой РЭТЭМ
_____ В.И. Туев
«___» _____ 2014

ЭКОЛОГИЯ ОРГАНИЗМОВ

Методические указания к лабораторному практикуму для направления
подготовки 022000.62 – Экология и природопользование

Разработчик:
Ассистент каф. РЭТЭМ
_____ М.В. Минина

Томск 2014

Минина М.В.

Экология организмов: методические указания к лабораторному практикуму / М. В. Минина. Томск: ТУСУР, 2014. – 27 с.

Практикум содержит описания трех лабораторных работ по основным разделам курса «Экология организмов», правила работы в лаборатории, требования к оформлению отчетов. В описании работ содержатся необходимые теоретические аспекты и методика выполнения, контрольные вопросы. Ко всему циклу лабораторных работ прилагается общий список рекомендуемой литературы.

Указания предназначены для студентов, обучающихся по направлению 022000.62 – Экология; а также преподавателям, студентам и аспирантам технических вузов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ	6
ПОРЯДОК ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ	7
Лабораторная работа № 1. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	8
Краткие теоретические сведения.....	8
Принадлежности к лабораторной работе.....	9
Порядок выполнения работы.....	9
Контрольные вопросы.....ю.....	14
Лабораторная работа № 2. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	15
Краткие теоретические сведения.....	15
Принадлежности к лабораторной работе.....	18
Порядок выполнения работы.....	18
Контрольные вопросы.....	20
Лабораторная работа № 3. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА РАЗВИТИЕ ГРИБОВ	21
Краткие теоретические сведения.....	21
Принадлежности к лабораторной работе.....	22
Порядок выполнения работы.....	23
Контрольные вопросы.....	25
ЛИТЕРАТУРА	26
Приложение А. Пример оформления титульного листа.....	27

ВВЕДЕНИЕ

Курс «Экология организмов» относится к профессиональному циклу. В рамках предмета важная роль отводится практическим занятиям, которые наряду с теоретическим лекционным курсом способствуют созданию цельного представления о закономерностях воздействия факторов среды на организмы, их приспособляемости к условиям среды обитания, а также помогают в приобретении навыков самостоятельной работы с биологическим материалом и книгой как справочником. На практических занятиях основное внимание уделяется изучению влияния факторов среды на развитие организмов.

Настоящие методические указания состоят из трех лабораторных работ, составленных по единому плану. В каждой работе дается объект изучения, краткие теоретические сведения о влиянии фактора среды на организмы, затем перечень принадлежностей к лабораторной работе, необходимых для отработки данной темы. В разделе «Порядок выполнения работы» указывается, что студент должен выполнить, изучить и усвоить на каждом занятии. Для проверки усвоения материала студентами и самоконтроля служат вопросы, ответы на которые требуют дополнительной подготовки по соответствующим разделам учебников.

На лабораторные работы по дисциплине «Экология организмов» предусмотрено 12 часов.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории можно только в халатах. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.

2. Во избежание отравлений категорически запрещается принимать пищу и хранить продукты питания в лаборатории.

3. Категорически запрещается выносить за пределы лаборатории посуду, материалы, которые используются для проведения лабораторных работ.

4. Не класть на стол личные вещи (сумки, папки и др.), держать их в специально отведенных местах.

5. Если микроорганизмы попадают на оборудование или пол (разобьется пробирка или чашка Петри, на которой они росли), об этом надо сразу же сообщить преподавателю или лаборанту, а на данном месте провести обеззараживание, залив его дезинфицирующим раствором. После этого необходимо провести уборку.

6. Во время выполнения практических работ нельзя открывать форточки. Необходимо соблюдать тишину, избегать лишнего движения и хождения, открывания и закрывания дверей – всего того, что усиливает движение воздуха.

7. Каждый студент перед началом работы должен проверить, все ли необходимое находится на его столе.

8. Перед началом работы столы протирают дезинфицирующим раствором.

9. Раздача необходимого для проведения лабораторной работы материала и посуды проводится лаборантом или дежурными.

10. Нельзя оставлять без присмотра работающие установки, включенные электронагревательные приборы, горящие спиртовки.

11. В присутствии преподавателя включить приборы, входящие в установку, в соответствии с инструкциями к приборам и описанием лабораторной работы. Если приборы не работают, сообщить об этом преподавателю или зав. лабораторией.

12. Категорически запрещается использовать посуду, имеющую трещины или отбитые края.

13. При переносе сосудов с горячими жидкостями держать их обеими руками: одной поддерживать дно, другой - верхнюю часть; руки от ожога предохранять полотенцем, которым обертывают сосуд.

14. По окончании работы все используемые инструменты обеззараживают.

Бактериальные петли и иглы прокаливают над пламенем спиртовки, а пипетки и стекла помещают в дезинфицирующий раствор.

15. Все используемые при работе микробные культуры сдают лаборанту, который проводит их обеззараживание или в автоклаве, или в дезинфицирующем растворе.

16. В конце занятий надо привести в порядок рабочий стол, протереть его дезинфицирующим раствором, тщательно вымыть руки и снять халат.

ПОРЯДОК ОФОРМЛЕНИЯ РАБОТ

Обязательными элементами отчета являются:

- титульный лист, содержащий название вуза, кафедры, название и номер лабораторной работы, наименование дисциплины, по которой выполнена работа, № группы и ФИО студентов, входящих в подгруппу, дату исполнения, ФИО преподавателя, год;

- основная часть, к которой относятся цель работы, лабораторное задание, полученные по работе результаты, оформляемые в табличном, графическом или другом виде, ответы на контрольные вопросы;

- выводы по результатам работы, которые являются важной частью отчета и подлежат защите.

Отчет оформляется в соответствии с требованиями ОС ТУСУР 01-2013. Пример оформления титульного листа приводится в приложении А.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ (4 часа, самостоятельная работа – 1 час)

Цель работы: изучить влияние pH среды на развитие бактерий.

Предмет и содержание работы

Объект изучения: бактерии.

Краткие теоретические сведения

Концентрация водородных ионов (pH - показатель концентрации водородных ионов) в среде обитания является важным фактором, определяющим возможность роста и размножения микроорганизмов. Водородный показатель реакции среды pH показывает степень её кислотности (pH от 7 до 1) или щелочности (pH от 7 до 14). Нейтральная реакция среды соответствует pH 7. Меняя реакцию среды, можно регулировать интенсивность развития и биохимическую активность микробов.

В природных условиях прокариоты (бактерии) могут развиваться в диапазоне pH от 1 до 11. Большинство микроорганизмов развиваются в слабощелочной среде (pH 7,2-7,6), дрожжи и плесневые грибы лучше культивируются при pH 3-6. При снижении pH до 5 гнилостные бактерии не развиваются, в то время как при такой реакции наиболее активно проявляется ферментативная активность дрожжей. В зависимости от отношения к pH среды их можно разделить на три группы: *нейтрофилы*, *ацидофилы* и *алкалофилы*.

Нейтрофилы предпочитают нейтральную реакцию среды, оптимальный pH для их роста составляет 6,8-7,3, минимальный – 4, максимальный – 9. Подавляющее большинство бактерий относятся к нейтрофилам (гнилостные бактерии, возбудители отравлений, бактерии группы кишечной палочки и др.)

Ацидофилы (кислотолюбивые) развиваются при оптимальном pH 4 и выше (уксуснокислые и другие бактерии, продуцирующие органические кислоты). Плесневые грибы, дрожжи и бактерии рода *Acetobacter* лучше всего развиваются в кислой среде при pH = 3–5.

Алкалофилы (щелочелюбивые) развиваются при оптимальном pH 9 и выше (некоторые представители бактерий кишечной группы - холерный вибрион и др.).

Споры бактерий обычно более устойчивы к изменениям pH, чем вегетативные клетки.

Влияние pH на развитие микроорганизмов основано на том, что реакция среды влияет на активность ферментов, так как каждый фермент проявляет свою активность только при определенных значениях pH. От концентрации ионов водорода зависит также поступление питательных веществ внутрь клетки и

физическое состояние белков. Так, денатурация и выпадение большинства белков в осадок под действием высоких температур наиболее быстро и полно происходит в слабокислой среде.

Зная, отношение различных микроорганизмов к реакции среды, и регулируя рН, можно подавлять или стимулировать их развитие, что имеет большое практическое значение. Так, неблагоприятное действие кислой среды на гнилостные бактерии положено в основу хранения некоторых пищевых продуктов в маринованном и квашеном виде.

Принадлежности к лабораторной работе:

1. Среда МПА.
2. Стерильные чашки Петри 4 шт.
3. 10% раствор HCl.
4. 10% раствор NaOH.
5. Дистиллированная вода.
6. Водопроводная вода.
7. Почва.
8. Колбы объемом 50 мл 4 шт.
9. Стерильные пипетки 4 шт.
10. Пробирки 10 шт.
11. Мерный цилиндр.
12. Марлевые салфетки.
13. Вата.
14. Дезинфицирующая жидкость.
15. Маркер черный перманентный.
16. Шпатель Дригальского.
17. Бумага для стерилизации.
18. Линейка.
19. РН-метр.
20. Автоклав.
21. Термостат.
22. Весы.

Порядок выполнения работы

1) *Провести посев бактерий на питательные среды с различным значением рН.*

Ход работы:

1. Приготовить стерильную среду МПА (мясо-пептонный агар), согласно инструкции на этикетке среды с разным значением рН: 3, 5, 7, 9. Разное значение

pH среды добиваются путем добавления кислоты или щелочи. Значение pH определяют pH-метром или лакмусовыми полосками. Количество среды 20 мл с одним значением pH. Среда разливают в подписанные флаконы, закрывают пробками и колпачками из бумаги для стерилизации и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °C в течение 15 минут. Среда охлаждают до 45-50 °C, разливают в четыре стерильные чашки Петри и дают застыть. Чашки обязательно подписывают (дата, pH, фамилия студента или номер).

2. Приготовить стерильную воду для разведения: в колбу налить 110 мл воды, закрыть пробкой и колпачком из бумаги для стерилизации. Простерилизовать автоклавированием вместе со флаконами со средой при температуре 121 °C в течение 15 минут.

3. Приготовить навеску почвы 1 г: шпателем или ложкой берут из банки почву и взвешивают 1 г.

4. Приготовить 10 разведений: стерильную воду, остывшую до комнатной температуры, разлить в 10 пробирок по 9 мл воды. Затем в первую пробирку положить 1 г почвы, закрыть резиновой пробкой и тщательно перемешать, встряхивая 1 минуту (это 1-е разведение, 10^{-1}). Полученное разведение тщательно перемешивают стерильной пипеткой, вбирая и в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Готовят 2-е разведение (10^{-2}): пипеткой набирают 1 мл и переносят во вторую пробирку, тщательно перемешивая. Таким же образом готовят и последующие разведения. Для приготовления каждого разведения следуют обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

5. Провести посев: стерильной пипеткой берут каплю водяной суспензии из 7-10 разведения и высевают поверхностным способом. Для этого на середину чашки Петри со средой стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стерильным стеклянным шпателем Дригальского по поверхности среды (рис. 1). Таким способом засевают четыре чашки со средой, имеющей разные значения pH. На крышке чашки обязательно указывается номер разведения.

6. Засеянные чашки помещают в термостат на 48 ч при температуре 25 °C. Через двое суток выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

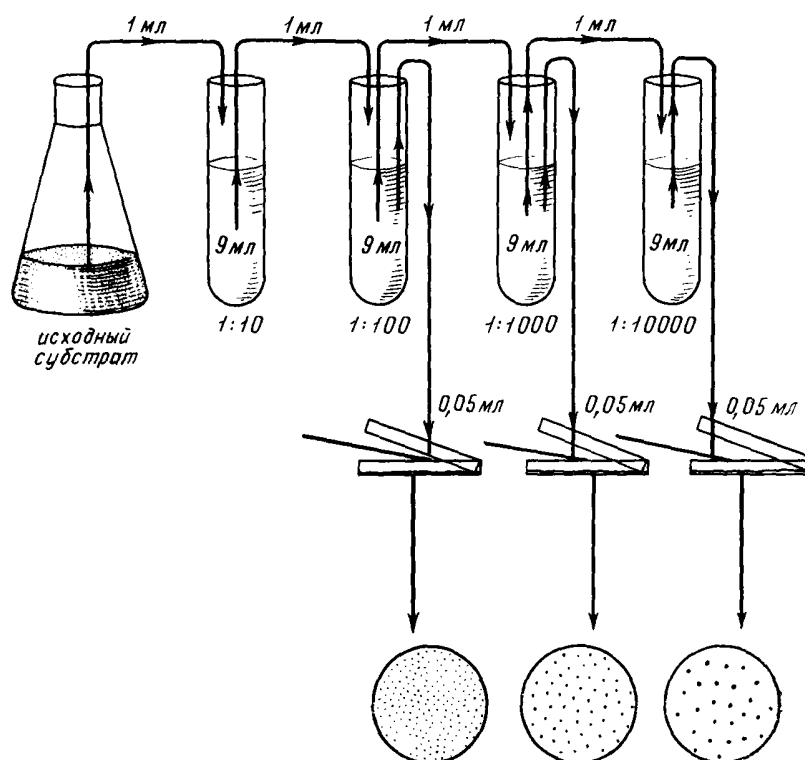


Рис. 1. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

2) Провести оценку роста бактерий на средах с различными значениями pH.

Ход работы:

1. Подсчитать количество колоний бактерий на всей поверхности чашки Петри, не открывая их. При подсчете колоний рекомендуется использовать лупы. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Лучшим разведением считают то, при высеве из которого в чашке Петри вырастает от 30-50 до 100-150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют.

2. Рассчитать число клеток в 1 мл исследуемого субстрата. Для этого используют формулу:

$$M = a \cdot 10^n / V,$$

где M – количество клеток в 1 мл; a – среднее число колоний при высеве разведения, из которого сделан высеv; V – объем суспензии, взятый для посева, в мл; 10^n – коэффициент разведений.

3. Рассчитать число клеток в 1 г сырой почвы. Для этого умножают число колоний в 1 мл на степень разведения.

4. Рассчитать число клеток в 1 г абсолютно сухой почвы. Это необходимо для сравнения численности бактерий в разных почвах.

Пример расчета при 30% влажности почвы.

Составляем пропорцию и находим x :

$$\begin{array}{l} 0,7 \text{ г} - \text{количество колоний} \\ 1 \text{ г} - x \end{array}$$

5. Полученные данные заносят в таблицу 1.

Таблица 1. Результаты численности бактерий в 1 г почве при различных значениях рН

Численность бактерий, кл./ г	Значение рН			
	3	5	7	9
Сырая почва				
Абсолютно сухая				

6. Определить качественный состав бактерий. Колонии на чашке группируют по культуральным признакам. К ним относятся:

- цвет колонии (белый, серый, розовый, желтый, зеленый и т. д.);
- форма колоний (округлая, амебовидная, ризоидная, плоская) (рис. 2);
- размеры колоний (10 мм и больше в диаметре – крупная, от 1 до 10 мм – средняя, 1 мм – точечная);
- поверхность (гладкая, шероховатая, складчатая, сухая, морщинистая, блестящая, в виде мучнистой присыпки);
- профиль (конусовидный, плоский, выпуклый, кратерообразный) (рис. 3);
- край колонии (ровный, волнистый, лопастный, зубчатый, бахромчатый) (рис. 4);
- консистенция (тестообразная, пастообразная, водянистая, тянущаяся, плотная, мажущаяся, маслянистая, пленчатая). Консистенцию колонии устанавливают прикосновением к ее поверхности микробиологической петлей или иглой.

Данные записывают в таблицу 2.

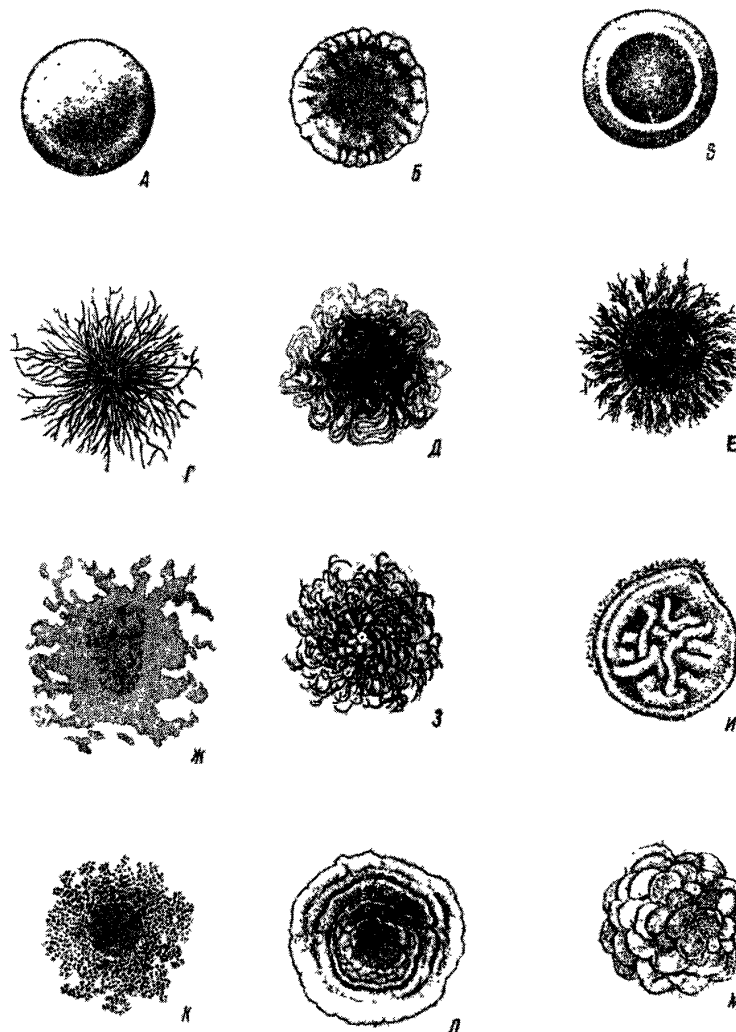


Рис. 2 Формы колоний: А – круглая, Б – круглая с фестончатым краем, В – круглая с валиком по краю, Г, Д – ризоидные, Е – с ризоидным краем, Ж – амёбовидная, З – нитевидная, И – складчатая, К – неправильная, Л – concentрическая, М - сложная

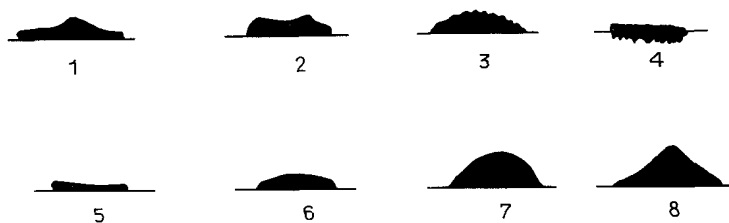


Рис. 3 Профиль колонии: 1 – изогнутый, 2 – кратерообразный, 3 – бугристый, 4 – растающий в субстрат, 5 – плоский, 6 – выпуклый, 7 – каплевидный, 8 – конусовидный

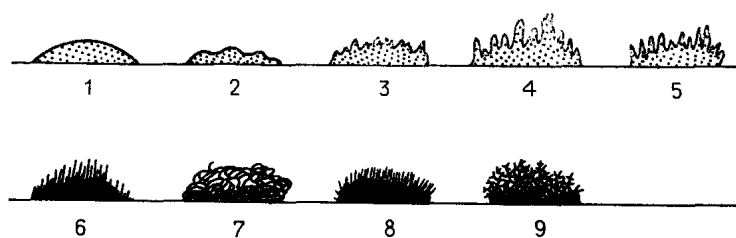


Рис. 4 Край колонии: 1 – гладкий, 2 – волнистый, 3 – зубчатый, 4 – лопастной, 5 – неправильный, 6 – реснитчатый, 7 – нитчатый, 8 – ворсинчатый, 9 – ветвистый

Таблица 2 – Культуральные признаки колоний при различных значениях рН

№ колонии / культуральный признак	1	2	3	4	5 и т. д.
рН среды					
Цвет					
Форма					
Размер, мм					
Поверхность					
Профиль					
Край					
Консистенция					

7. Сформулировать выводы и оформить отчет по данной работе.

Контрольные вопросы

1. При каких значениях рН развивается большинство микроорганизмов в природных условиях?
2. Дайте характеристику нейтрофилам.
3. Опишите условия развития ацидофилов.
4. Дайте характеристику алкалофилам.
5. На что и как в организме влияет концентрация ионов водорода?
6. Какое практическое значение имеет изменение рН для человека?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ (4 часа, самостоятельная работа – 1 час)

Цель работы: изучить влияние температуры на развитие бактерий.

Предмет и содержание работы

Объект изучения: бактерии.

Краткие теоретические сведения

Температура является важнейшим фактором внешней среды. Она определяет скорость размножения микроорганизмов, а также интенсивность протекания химических реакций в процессах обмена веществ в клетках. При переходе к крайним температурам жизненные процессы сначала замедляются, а затем или совсем приостанавливаются, и жизнь переходит в скрытую форму, или вообще прекращаются.

Микроорганизмы могут переносить значительные колебания температуры. Для нормальной жизнедеятельности микробной клетки необходима определенная температура. Различают три температурные точки: оптимальную, минимальную и максимальную, при которых может проявляться их жизнедеятельность различной интенсивности. Оптимальная температура та, при которой наиболее интенсивно растут и развиваются микроорганизмы. Минимальная температура - это самая низкая, при которой еще возможно развитие микробов. Ниже этой температуры микроорганизмы снижают свою биохимическую активность, но не погибают, а переходят в анабиотическое состояние, т.е. состояние скрытой жизни, напоминающее зимнее оцепенение многих хладнокровных (лягушек, змей, ящериц). Максимальная - это самая высокая температура, при которой еще возможны рост и развитие микроба. Выше максимальной температурной точки микроб погибает.

По отношению к температуре различают три группы микроорганизмов: психрофилы, мезофилы и термофилы.

Психрофилы (холодолюбивые) – это микроорганизмы, нормально развивающиеся при относительно низких температурах. Оптимальной для них является температура 15-20 °С, минимальной -10-0, максимальной 30-35 °С. К этой группе относятся некоторые представители кокковой микрофлоры, палочковидные бактерии, плесневые грибы, железобактерии и др., вызывающие порчу продуктов при хранении в холодильниках. Их часто обнаруживают на поверхности рыб. Многие из них, относящиеся к родам *Pseudomonas*,

Achromobacter, способны быстро вызывать микробиальную порчу рыбы, хранящейся при температуре 0 °С. К психрофилам относится большинство светящихся бактерий рода *Photobacterium*. Их развитие в морской воде вызывает ее свечение.

Мезофилы - наиболее распространенная в природе группа микроорганизмов, обитающих в воде, воздухе, почве, в живых организмах. Эта группа микроорганизмов, которые развиваются при средних температурах. Оптимальной для них является температура 25-30 °С, минимальной 5-10, максимальной 50-60 °С. К ним относятся представители дрожжей, мицелиальных грибов, молочнокислых бактерий, бактерий кишечной группы (стафилококки, фекальные стрептококки) и многие другие, а также возбудители порчи пищевых продуктов, пищевых отравлений и заболеваний человека. Вместе с тем большинство промышленных процессов (получение органических кислот, ферментов и т. д.) осуществляется с помощью мезофилов.

Термофилы (теплолюбивые) довольно широко распространены в природе. Микробы, развивающиеся при сравнительно высокой температуре. Оптимальной для них является температура 50-60 °С, минимальной 30-35, максимальной 75-85 °С. Они могут обитать в горячих источниках, в верхних слоях почвы, в горячих источниках, в песках пустынь, в кишечнике человека и животных, так как большинство термофилов образуют устойчивые споры (сохраняют жизнедеятельность при температуре выше 85 °С). Термофилы являются основными возбудителями порчи мясных и мясорастительных консервов, принимают участие в самонагревании силоса, влажного зерна, сена, хлопка, муки и др.

Регулируя температуру, можно управлять жизнедеятельностью микроорганизмов.

Наиболее губительны для микроорганизмов высокие температуры. При воздействии высокой температуры, превышающей максимум выносливости микроорганизмов, происходит их отмирание (летальная температура). Повышение температуры приводит к ускорению биохимических реакций, но скорость реакций в клетке изменяется непропорционально, что приводит к дисбалансу и нарушению протекания метаболических процессов. Бактерии, не обладающие способностью образовывать споры, погибают при нагревании во влажной среде до 60-70 °С через 15-30 мин, до 80-100 °С – через несколько секунд или минут. Высокие температуры (70–80 °С и выше) оказывают бактерицидное действие. Под их воздействием происходит денатурация белка, приводящая к нарушению

проницаемости клеточных стенок, потере активности ферментов, изменению структуры цитоплазмы и, как следствие всего этого, гибели клетки.

У спор бактерий термоустойчивость значительно выше. Они способны выдерживать 100 °С в течение 1-6 ч, при температуре 120-130 °С споры бактерий во влажной среде погибают через 20-30 мин. Споры плесеней менее термостойки.

Действие высоких температур на микроорганизмы является губительным, и это явление используется при консервировании пищевых продуктов с целью уничтожения вызывающих их порчу микроорганизмов.

К низкой температуре микроорганизмы более устойчивы, размножение и биохимическая активность микроорганизмов при температуре ниже минимальной прекращаются, гибель самих клеток чаще всего не наступает, а они переходят в состоянии *анабиоза* («скрытой жизни»). В таком состоянии многие микроорганизмы, и особенно их споры, не размножаются, но остаются жизнеспособными длительное время (гнилостные бактерии, микроорганизмы, вызывающие пищевые отравления и патогенные). При повышении температуры споры прорастают в вегетативные клетки и начинают активно размножаться. Это свойство микроорганизмов следует учитывать при хранении и дальнейшей кулинарной обработке пищевых продуктов. Например, в замороженном мясе могут длительно сохраняться сальмонеллы, а после размораживания мяса они в благоприятных условиях быстро накапливаются до опасного для человека количества.

Некоторые виды бактерий и плесневых грибов выдерживают температуру жидкого воздуха (- 190 °С) и жидкого водорода (- 253 °С).

Низкие температуры оказывают в основном бактериостатическое действие вследствие замедления протекания биохимических процессов (замедления метаболизма). Гибель микроорганизмов (бактерицидное действие) наблюдается в случае чисто механического разрыва клеток образующимися в них кристаллами льда. Низкие температуры вызывают гибель микроорганизмов тогда, когда замерзает среда, в которой они обитают, или происходят резкие скачки температуры, например, при многократно повторяющемся замораживании и оттаивании. Чем меньше образующиеся кристаллы льда и чем равномернее они распределены в клетке, тем меньше гибель микроорганизмов. И наоборот, чем крупнее кристаллы, тем больше клеток погибнет. Поэтому наиболее губительны для микроорганизмов температуры, которые соответствуют криоскопической точке цитоплазмы (от - 2 до - 5,6 °С). Чем дальше температура отстоит от криоскопического значения, тем меньше гибель микроорганизмов.

Низкие температуры применяют для сохранения скоропортящихся продуктов. Некоторые микроорганизмы временно выдерживают очень низкие температуры (кишечная палочка, брюшнотифозная палочка, споры бактерий, некоторые мицелиальные грибы и дрожжи), сохраняют способность к прорастанию.

Принадлежности к лабораторной работе:

1. Среда МПА.
2. Стерильные чашки Петри 3 шт.
3. Дистиллированная вода.
4. Колбы объемом 50 мл 3 шт.
5. Марлевые салфетки.
6. Вата.
7. Дезинфицирующая жидкость.
8. Маркер черный перманентный.
9. Бумага для стерилизации.
10. Линейка.
11. Автоклав.
12. Термостат.
13. Весы.

Порядок выполнения работы

1) *Провести выращивание бактерий при различных температурах.*

Ход работы:

1. Приготовить стерильную среду МПА (мясо-пептонный агар), согласно инструкции на этикетке среды. Количество среды 80 мл. Среду заливают в подписанный флакон, закрывают пробкой и колпачком из бумаги для стерилизации и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут. Среду охлаждают до 45-50 °С, разливают в три стерильные чашки Петри и дают застыть. Чашки обязательно подписывают (дата, температура, фамилия студента или номер).

2. Методом седиментации (оседания) провести посев: чашки Петри ставят на ровную поверхность, открывают на 5 минут, закрывают и оставляют на семь суток.

3. Микроорганизмы выращивают при 5 °С в холодильнике, при 25 °С – в комнатных условиях, недалеко от батареи центрального отопления, при 40 °С – в термостате. Через семь суток выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

2) *Провести оценку роста бактерий при различных температурах.*

Ход работы:

1. Подсчитать количество колоний бактерий на всей поверхности чашки Петри, не открывая их. При подсчете колоний рекомендуется использовать лупы. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Лучшим разведением считают то, при высеве из которого в чашке Петри вырастает от 30-50 до 100-150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют.

2. Рассчитать число микробов в 1 м³ воздуха. При этом учитывают следующее: на площади в 100 см² в течение 5 мин оседает столько микроорганизмов и спор, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Для этого рассчитывают площадь дна чашки Петри по формуле:

$$S = \pi d^2/4,$$

где $\pi = 3,14$; d – диаметр чашки Петри.

Затем подсчитывают количество единиц бактерий в 100 см³ (0,01 м³) воздуха: количество колоний умножают на 100 и делят на площадь дна чашки Петри (S).

3. Полученный данные заносят в таблицу 3.

Таблица 3. Результаты численности бактерий в 1 м³ воздуха при различных значениях рН

	Значение температуры, °С		
	5	25	40
Численность бактерий, кл./ м ³			

4. Определить качественный состав бактерий (аналогично пункту 6 лабораторной работы № 1). Данные записывают в таблицу 4.

5. Сформулировать выводы и оформить отчет по данной работе.

Таблица 4 – Культуральные признаки колоний при различных температурах

№ колонии / культуральный признак	1	2	3	4	5 и т. д.
Температура					
Цвет					
Форма					
Размер, мм					
Поверхность					
Профиль					
Край					
Консистенция					

Контрольные вопросы

1. Какие температурные точки выделяют для жизнедеятельности микроорганизмов? Дайте им характеристику.
2. Дайте определение психрофилам. Приведите примеры организмов, относящиеся к этой группе.
3. Охарактеризуйте условия жизнедеятельности мезофилов.
4. При каких значениях температуры развиваются термофилы? Где могут жить эти организмы?
5. К каким последствиям приводит воздействие на организмов высоких температур? Где применяется это действие?
6. Что происходит с микроорганизмами при низких температурах? Где применяют это действие?
7. Почему наступает гибель микроорганизмов при низкой температуре?
8. Приведите примеры временно устойчивых микроорганизмов к действию высоких и низких температур.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА РАЗВИТИЕ ГРИБОВ (4 часа, самостоятельная работа – 1 час)

Цель работы: изучить влияние концентрации глюкозы на развитие плесневого гриба и дрожжей.

Предмет и содержание работы

Объект изучения: плесневые грибы, дрожжи.

Краткие теоретические сведения

Поваренная соль и сахар издавна используются для повышения стойкости продуктов к микробной порче и лучшей сохранности пищевых продуктов. Повышение содержания растворенных веществ (соли или сахара) в питательной среде сказывается на величине осмотического давления внутри микроорганизмов, вызывает их обезвоживание.

Осмотическое давление среды определяется концентрацией растворенных в ней веществ. Чем выше концентрация раствора, тем больше его осмотическое давление. Осмотическое давление внутри клетки микроорганизма несколько выше, чем во внешней среде. Это является условием нормальной жизнедеятельности организмов. Поддержание клетками оптимального для жизнедеятельности данного микроорганизма осмотического давления происходит благодаря их способности к *осморегуляции*. В результате осморегуляции сохраняется его жизнеспособность, даже если осмотическое давление во внешней среде колеблется в относительно широких пределах.

При попадании микроорганизмов в субстрат с ничтожно малой концентрацией веществ (например, в дистиллированную воду) в их клетках наблюдается *плазмолиз* (чрезмерное насыщение цитоплазмы водой), что приводит к разрыву ЦПМ и клеточной стенки, и клетка погибает.

При попадании микроорганизмов в субстрат с концентрацией веществ выше оптимальных значений в их клетках наступает *плазмолиз* (обезвоживание цитоплазмы), ее объем уменьшается, что влечет повреждение ЦПМ. При плазмолизе в клетках приостанавливается обмен веществ, они переходят в состояние анабиоза, в котором одни микроорганизмы могут длительно сохраняться, не теряя жизнеспособности, а другие погибают. На этом основаны некоторые способы сохранения различных продуктов с помощью концентрированных растворов сахара или соли.

Некоторые виды дрожжей развиваются в меде, некоторые бактерии – на соленой рыбе. Микроорганизмы, способные существовать в субстратах с высоким осмотическим давлением, называют *осмофилами*. Большинство природных сред обитания с высоким осмотическим давлением содержит высокие концентрации солей (особенно NaCl).

Микроорганизмы, которые растут в таких средах, называют *галофилами*. Они представлены двумя основными типами: умеренными и крайними галофилами. *Умеренные* галофилы могут развиваться при концентрации соли 1-2%, хорошо растут в средах с содержанием соли 10%, и могут выносить даже содержание соли в среде 20%. *Крайние* галофилы не развиваются при содержании соли ниже 12-15% и могут хорошо расти при концентрации соли в среде 30% (насыщенный раствор).

При повышении концентрации поваренной соли в субстрате более 3-4 % размножение многих микроорганизмов замедляется, при концентрации более 7-12% — прекращается. Большинство микроорганизмов, особенно группа гнилостных бактерий и кишечная палочка, обладают слабой устойчивостью к повышенному осмотическому давлению.

Высокие концентрации сахара (выше 55-65 %) прекращают размножение большинства микроорганизмов, это используется при приготовлении из плодов и ягод варенья, джема или повидла. Однако эти продукты тоже могут подвергаться порче в результате размножения осмофильных плесеней или дрожжей.

Принадлежности к лабораторной работе:

1. Сухие дрожжи.
2. Культура плесневого гриба.
3. Среда Сабуро.
4. Глюкоза.
5. Стерильные чашки Петри 4 шт.
6. Пробирки 4 шт.
7. Колбы объемом 50 мл 4 шт.
8. Ватные пробки для пробирок.
9. Бактериальная петля.
10. Стерильные пипетки 4 шт.
11. Штатив для пробирок.
12. Дистиллированная вода.
13. Марлевые салфетки.
14. Вата.
15. Дезинфицирующая жидкость.

16. Маркер черный перманентный.
17. Спиртовка.
18. Бумага для стерилизации.
19. Автоклав.
20. Термостат.
21. Весы.

Порядок выполнения работы

1) *Провести посев плесневых грибов на питательные среды с различной концентрацией глюкозы.*

Ход работы:

1. Приготовить стерильную среду Сабуро с агаром или сусло-агар, согласно инструкции на этикетке среды с разной концентрацией глюкозы: 20, 40, 60 % и без нее (контрольный опыт). Количество среды 20 мл одной концентрации. Среда разливают в подписанные флаконы, закрывают пробками и колпачками из бумаги для стерилизации и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут. Среду охлаждают до 45-50 °С, разливают в четыре стерильные чашки Петри и дают застыть. Чашки обязательно подписывают (дата, концентрация глюкозы, фамилия студента или номер).

2. Приготовить водяную суспензию спор: берут культуру плесневого гриба, проводят по ним бактериальной петлей, смоченной в воде для лучшего прилипания к ней спор. Затем вносят петлю в пробирку со стерильной водой и тщательно перемешивают. Споры переносят несколько раз. Петлю стерилизуют в пламени спиртовки.

3. Провести посев: стерильной бактериальной петлей берут каплю водяной суспензии спор плесневого гриба и переносят на чашки Петри со средами, прикасаясь ребром петли в центр каждой чашки.

4. Засеянные чашки помещают в термостат на 48 ч при температуре 25 °С. Через двое суток выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

2) *Провести посев дрожжей на питательные среды с различной концентрацией глюкозы.*

Ход работы:

1. Приготовить стерильную среду Сабуро, согласно инструкции на этикетке среды, с разной концентрацией глюкозы: 20, 40, 60 % и без нее (контрольный опыт). Количество среды 10 мл при одной концентрации глюкозы. Наливают

среды в четыре пробирки на 1/3, закрывают пробками и колпачками из бумаги для стерилизации. Пробирки обязательно подписывают (дата, концентрация глюкозы, фамилия студента или номер). Пробирки со средами стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 минут, дают остыть.

2. Приготовить суспензию дрожжей: небольшое количество сухих дрожжей помещают в пробирку с водой и тщательно перемешивают до их растворения.

3. Провести посев: стерильной микропипеткой 0,1 мл суспензии добавляют в пробирки со средой, остывшие до комнатной температуры.

4. Пробирки с засеянными средами ставят в штатив и помещают в термостат на 48 ч при температуре 25 °С. Через двое суток выращенные культуры переставляют в холодильник и хранят там до следующего занятия.

3) Провести оценку интенсивности роста плесневого гриба на питательных средах с различной концентрацией глюкозы.

Ход работы:

1. Влияние концентрации глюкозы в среде на рост плесневого гриба определяют по интенсивности развития мицелия. Содержимое каждой чашки Петри тщательно просматривают.

2. Сравнить рост мицелия при разных концентрациях глюкозы. При сравнении полученных результатов пользуются условными обозначениями: отсутствие роста (-), слабый рост (+), умеренный рост (++) , обильный рост (+++).

3. Полученные данные заносят в таблицу 1 и формулируют выводы.

4) Провести оценку интенсивности роста дрожжей на питательных средах с различной концентрацией глюкозы.

Ход работы:

1. Интенсивности роста дрожжей определяется по степени мутности содержимого пробирки. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями.

2. Сравнить ее содержимым других пробирок. При сравнении полученных результатов пользуются условными обозначениями: отсутствие роста (-), слабый рост (+), умеренный рост (++) , обильный рост (+++).

3. Полученные данные заносят в таблицу 5 и формулируют выводы.

Таблица 5. Изменение развития дрожжей при различных концентрациях глюкозы

Показатель интенсивности развития	Оценка роста при концентрации глюкозы, %			
	0	20	40	60
Мицелий плесневого гриба				
Дрожжи				

4. Оформить отчет по данной работе.

Контрольные вопросы

1. К чему приводит повышение содержания растворенных веществ в питательной среде?
2. Осмотическое давление внутри клетки микроорганизма несколько выше или ниже, чем во внешней среде?
3. Как происходит поддержание клетками оптимального для жизнедеятельности микроорганизма осмотического давления?
4. Дайте определение плазмолизу. К чему приводит это явление?
5. Какие организмы и почему относят к осмофилам?
6. Охарактеризуйте условия жизнедеятельности галофилов.
7. Назовите практическое значение повышения осмотического давления среды обитания микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабинская А. С., Блинковская Л. П., Ещина А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. М. : Медицина, 2004. 576 с.
2. Методы общей микробиологии. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1984. – 472 с.
3. Николайкин Н. И. Экология: Учебник для вузов / Н.И. Николайкин, Н.Е. Николайкина, О. П. Мелехова. – 5-е изд., испр. и доп. М. : Дрофа, 2006. 622 с.
4. Передельский Л. В. Экология: Учебник для вузов / Л. В. Передельский, В. И. Коробкин, О. Е. Приходченко. М. : Проспект, 2006. 507 с.
5. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 2-е изд., перераб. и доп. М. : Колос, 1979. 216 с.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н. С. Егорова. М. : Изд-во МГУ, 1995. 224 с.

Приложение А

Пример оформления титульного листа

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СИСТЕМ УПРАВЛЕНИЯ
И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ (ТУСУР)

Кафедра радиоэлектронных технологий и экологического мониторинга
(РЭТЭМ)

Наименование темы работы (прописными буквами)

Лабораторная работа по дисциплине
«Экология организмов»

Студенты гр.

_____ Ф.И.О.

_____ /Подпись/

Руководитель работы

_____ /Должность/

_____ Ф.И.О.

_____ /Подпись/

_____ /Дата/

Томск 2014