

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

И. И. КОНЦЕВАЯ

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Практическое пособие
для студентов специальности 1-31 01 01 02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

**Гомель
УО «ГГУ им. Ф. Скорины»
2012**

УДК 579 (075.8)

ББК 28.4я73

К653

Рецензент:

Л. Н. Усачева, доцент кафедры зоологии и генетики УО «Брестский государственный университет имени А.С.Пушкина», кандидат биологических наук

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Концевая, И. И.

К653

Микробиология: практическое пособие для студентов специальности 1 – 31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / И. И. Концевая. Министерство образования РБ, Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2011. – 126 с.

Практическое пособие состоит из 13 занятий. Последовательно рассматриваются основные программные вопросы микробиологии: методы стерилизации, хранение культур микроорганизмов, способы культивирования микроорганизмов, приготовление нативных и фиксированных препаратов микроорганизмов, изучение морфологии клеток, питательные среды, способы генетического обмена у бактерий, общая характеристика и особенности молочнокислых бактерий и спорообразующих бактерий. Даны методические указания по проведению лабораторных занятий, вопросы для самоконтроля.

УДК 579 (075.8)

ББК 28.4я73

ISBN

© Концевая И. И., 2011

© Учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины», 2011

Содержание

Введение.....	4
<i>Тема 1</i> Методы стерилизации. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов.....	5
<i>Тема 2</i> Способы культивирования микроорганизмов.....	18
<i>Тема 3</i> Микроскопические методы исследования в микробиологии: устройство микроскопа и основные приемы микроскопирования живых микроорганизмов.....	25
<i>Тема 4</i> Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и изучение морфологии клеток.....	39
<i>Тема 5</i> Питательные среды: состав, назначение, техника приготовления	51
<i>Тема 6</i> Анализ микрофлоры воздуха	59
<i>Тема 7</i> Выделение чистых культур микроорганизмов	69
<i>Тема 8</i> Способы генетического обмена у бактерий	80
<i>Тема 9</i> Молочнокислые бактерии	88
<i>Тема 10</i> Спорообразующие бактерии: аэробные и анаэробные.....	96
Практическое занятие 10/1 Получение накопительных культур спорообразующих бактерий.....	106
Практическое занятие 10/2 Выявление эндоспор.....	106
<i>Тема 11</i> Выявление и количественный учет микроорганизмов почвенной микрофлоры.....	109
Практическое занятие 11/1 Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу и прямой счет микроорганизмов в почве.....	120
Практическое занятие 11/2 Выявление и определение численности микроорганизмов почвы высевом на питательную среду, изучение их культуральных особенностей.....	122
Литература.....	125

Введение

Микробиология – один из фундаментальных биологических курсов. Знание микробиологии необходимо для формирования мировоззрения об огромной роли микроорганизмов в природе и в жизни человека.

На лабораторных занятиях студенты знакомятся с общими принципами организации бактерий, овладевают специальными микробиологическими терминами и понятиями. На занятиях студенты пользуются накопительными культурами бактерий, вырабатывают технические навыки микроскопирования микроорганизмов, отрабатывают методы культивирования микроорганизмов, приемы получения накопительных и чистых культур микроорганизмов и т.д.

Руководство включает 13 занятий. Материал каждого из них начинается с плана, включает изложение теоретической части и вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля. Далее перечисляются материалы и оборудование, необходимые на занятии, ставится цель занятия, перечисляются задания для самостоятельной работы студентов на лабораторном занятии. Результаты наблюдений морфологических особенностей микроорганизмов студенты оформляют в виде рисунков, к которым следует предъявить строгие требования, считая зарисовку объектов одним из важнейших методов исследования.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса. Студенты, отработавшие лабораторные занятия, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследований.

Целью практического пособия является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами микробиологии и выработке практических навыков работы с культурами микроорганизмов. Материал пособия делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества.

Практическое пособие адресовано студентам специальности 1–31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Тема 1 Методы стерилизации. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов

- 1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории
- 2 Определение понятий асептика, антисептика, дезинфекция, стерилизация
- 3 Методы стерилизации
- 4 Методы контроля стерильности
- 5 Методы хранения культур микроорганизмов

1 Правила работы в учебной микробиологической лаборатории

Основное правило работы в микробиологической лаборатории – **правильная организация работы.**

Общие правила работы:

- 1 К работе в лаборатории допускаются лица после прохождения инструктажа по технике безопасности.
- 2 Все должны работать в медицинских халатах. Вход без халата воспрещен. Необходимо иметь сменную обувь.
- 3 Каждый студент имеет в лаборатории постоянное рабочее место и микроскоп для работы.
- 4 Каждый студент на занятии должен иметь тетрадь протоколов лабораторных работ, простой и цветные карандаши, ластик, линейку.
- 5 На каждое занятие назначают дежурных.
- 6 На рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов. Рабочее место должно содержаться в образцовом порядке, а личные вещи храниться в специально отведенных местах.
- 7 Перед началом работы и после ее окончания следует тщательно вымыть руки, а при необходимости – обработать дезинфицирующим раствором.
- 8 При попадании биологического материала на стол и т. д., это место необходимо тщательно вытереть дезинфицирующим раствором.
- 9 Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны помещать в сосуд с дезинфицирующим раствором либо специальные кюветы. Пинцеты, бактериальные петли, иглы прожигать в пламени горелки.

10 Отработанные культуры, использованный микробный материал подвергать обеззараживанию в автоклаве.

11 В ходе выполнения работы оформляется отчет – протокол соответствующего лабораторного занятия.

Запрещается:

1 Работать без халатов, выпускать из-под спецодежды шарфики и длинные манжеты, а из прически выпускать волосы.

2 Входить в учебную лабораторию в головных уборах и верхней одежде.

3 В лаборатории запрещается курить и принимать пищу. Не допускать излишних разговоров и ненужных переходов.

4 Класть на столы сумки и пакеты.

5 Включать мобильные телефоны во время занятий.

6 Принимать во время перерыва посетителей в лаборатории.

После окончания работы студенты должны:

1 Привести в порядок рабочее место.

2 Отработанные материал и инструменты, в том числе стекла, поместить в специальный кювет.

3 Привести в порядок микроскоп.

4 Тщательно вымыть руки с мылом.

5 Подать протокол работы преподавателю для подписи.

Работа студентов по подготовке к занятию:

Подготовка к лабораторным занятиям проводится согласно тематическому плану по вопросам методического руководства. В процессе подготовки студент должен изучить прорабатываемую тему по рекомендуемой литературе, конспекту лекций, руководству к лабораторным занятиям.

2 Определение понятий асептика, антисептика, дезинфекция, стерилизация

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на (в) какой-либо объект. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию инструментов и материалов.

Антисептика обозначает использование химических веществ, убивающих или подавляющих размножение микроорганизмов, находящихся на коже или слизистых оболочках макроорганизма.

Дезинфекция – уничтожение на (в) каком-либо объекте или окружающей среде микробов. Для дезинфекции используют фенол, формалин, спирт, соединения хлора (хлорамин, хлорную известь), йод, сулему, диацид, перекись водорода и т.д., а также термические, лучевые и другие воздействия.

Стерилизация – процесс, направленный на полное уничтожение в объекте всех жизнеспособных микроорганизмов и их спор.

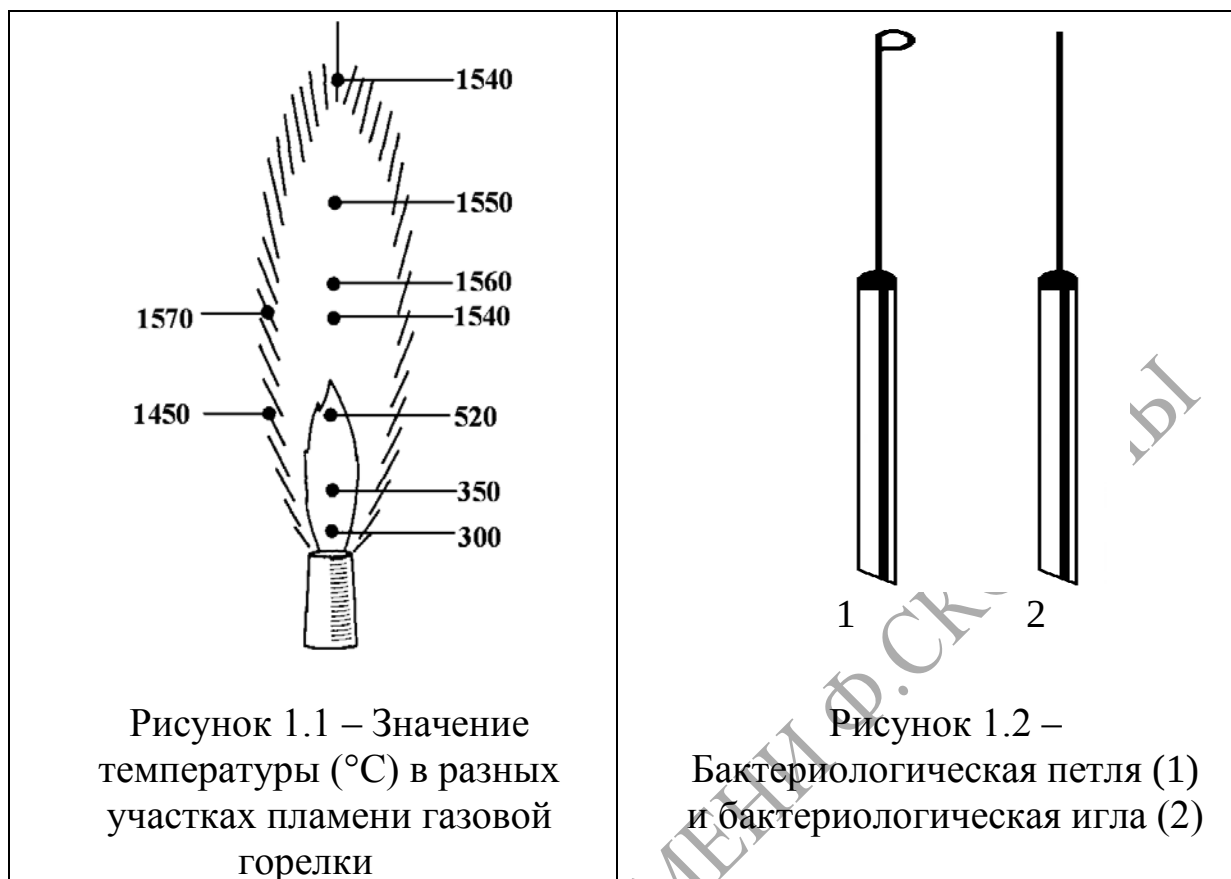
Знание и умелое применение методов стерилизации необходимо каждому специалисту микробиологу.

3 Методы стерилизации

Стерилизации подвергаются питательные среды, лабораторная посуда, инструменты, растворы и т. д. Можно условно выделить термическую и холодную стерилизацию.

К **методам термической стерилизации (стерилизации высокой температурой)** относят: прокаливание и обжигание в пламени спиртовки; кипячение; сухожаровую (горячим паром) стерилизацию; пастеризацию; стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование); дробную стерилизацию (тиндализацию);

Прокаливание и обжигание в пламени – наиболее быстрые и доступные методы стерилизации. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (до 1 560 °С), поэтому не следует опускать петлю непосредственно к горелке (рисунок 1.1). При прокаливании происходит сгорание микроорганизмов и их спор. Такими методами стерилизуют бактериологические петли, иглы (рисунок 1.2), шпатели, пинцеты, предметные и покровные стекла, фарфоровые ступки и другие инструменты. При **обжигании бактериологической петли (или иглы)** проволоку прокалывают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. При прокаливании петлю держат в пламени почти вертикально, чтобы вся проволока была равномерна раскалена. Сразу же после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами.



Кипячение – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30–60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в стерилизаторах. В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко, поскольку продолжительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности.

Дробная стерилизация (тиндализация или стерилизация текущим паром) используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые изменяют свойства при применении температур выше 100 °C. К таким объектам относятся витамины, некоторые среды, углеводы, молоко и т.д. Метод разработан в 1877 году Дж. Тиндалем. Согласно этому методу, жидкость доводят до 100 °C и продолжают выдерживать при этой температуре 10 мин. За это время все вегетативные клетки погибают, жизнеспособными остаются только споры. Затем жидкость охлаждают до температуры, оптимальной для прорастания спор (30 °C) и через несколько часов снова пропускают пар. Двух–трех подобных циклов обычно бывает

достаточно для уничтожения всех имеющихся спор. При тиндализации резервуар с кипящей водой расположен в нижней части аппарата, над ним расположена сетка с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами.

Сухожаровая стерилизация или стерилизация сухим горячим воздухом проводится в сушильных шкафах. Режим стерилизации: 160–170 °С на протяжении 2 часов. При этом предполагается, что погибают как клетки, так и споры. Таким способом стерилизуют стеклянную посуду, инструменты и др., завернутые в бумагу или закрытые ватно-марлевыми пробками для сохранения стерильности после стерилизации (таблица 1.1). Таким способом можно стерилизовать минеральные и растительные масла, жиры, вазелин, воск.

Таблица 1.1 – Условия стерилизации стеклянной посуды сухим жаром (горячим воздухом)

Температура, °С	Время, мин
140	180
150	150
160	120
170	60

Пастеризация заключается в однократном прогреве материала при температурах ниже 100 °С и направлена на уничтожение вегетативных клеток. Этот метод широко используется в пищевой промышленности для обработки продуктов, которые теряют вкусовую и пищевую ценность при кипячении: молока, ягодных и фруктовых сиропов, соков, пива и т. д. В микробиологической практике пастеризацией пользуются для получения накопительных культур спорообразующих бактерий. В лабораторных условиях пастеризацию проводят либо на водяной бане либо в ультратермостате при следующих режимах: 60–70 °С в течение 15–30 мин; 80 °С в течение 10–15 мин.

Стерилизация насыщенным паром под давлением или автоклавирование – один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию как высокой температуры, так и повышенному давлению пара. Погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных

приборах – автоклавах, закрывающихся герметично. Основные используемые режимы стерилизации следующие: 15–30 мин при избыточном давлении 0,5 атм (температура достигает 110–112 °С); 15–45 мин при избыточном давлении 1,0 атм (температура достигает 121 °С); 10–30 мин при избыточном давлении 1,5 атм (температура достигает 126 °С). Таким способом стерилизуют питательные среды, растворы, посуду, инструменты, фильтры и т. д.

При **холодной стерилизации** используют химические вещества или проводят воздействие на объект факторами физической природы. Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов предполагают использование дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифический эффект, либо использование антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов с избирательным противомикробным действием. Дезинфицирующие вещества классифицируются по группам: кислоты, щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые основания, фенольные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. Устойчивость микроорганизмов к их действию может существенно меняться в зависимости от таких факторов как концентрация активного компонента, длительность контакта, pH, температура, влажность, присутствие органического вещества. Химические средства неспецифического действия используются для обработки помещений, оборудования, различных предметов. Например, спирты используются в концентрации 60–70 % и эффективны в отношении вегетативных клеток. Фенолы и их производные применяются для дезинфекции помещений.

Среди используемых летучих стерилизующих веществ можно назвать окись этилена, окись пропилена, озон, метилбромид, формальдегид. Указанные вещества могут быть использованы для стерилизации пластмассовых центрифужных пробирок, пластмассовых чашек Петри, оптических инструментов, сыворотки крови и др.

Стерилизация фильтрованием используется для веществ, которые не выдерживают термической обработки (растворов белков, аминокислот, углеводов, витаминов, углеводов, антибиотиков, сыворотки). Способ заключается в пропускании жидкостей и газов через специальные мелкопористые фильтры, диаметр пор которых не превышает 0,45–0,20 мкм. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление.

Существуют два основных **типа фильтров – глубинные и мембранные**. Глубинные состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру и захват ими частиц определяется размером пор. Фильтры содержат различные природные (коалин, асбест, целлюлоза) или синтетические (производные целлюлозы) материалы. Различают фильтры: мембранные, получаемые на основе нитроцеллюлозы; асбестовые или фильтры Зейтца, получаемые на основе смеси асбеста и целлюлозы; фарфоровые или свечи Шамберлана, получаемые из смеси кварцевого песка и коалина, сплавленные между собой; стеклянные, полученные из стекла «Пирекс».

Перед употреблением фильтрующее устройство должно быть простерилизовано. Стерилизуют либо длительным кипячением либо автоклавированием. Прибор собирают в асептических условиях непосредственно перед работой. Фильтры Зейтца автоклавируют в собранном виде, предварительно завернув в бумагу.

Стерилизация с использованием облучения пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые (УФ) лучи (250–270 нм) используются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток и т.д. Время облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые в 3–10 раз более устойчивы. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью или другими защитными оболочками.

Недостатком при использовании данного метода стерилизации является низкая проникающая способность УФ-лучей.

Рентгеновское и γ -облучение также эффективно для стерилизации пластмасс, пищевых продуктов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. Наиболее чувствительны к γ -облучению вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад. γ -облучение используется для стерилизации больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов,

стероидов, пластмассового разового оборудования, шовного и перевязочного материала.

Необходим контроль остаточной радиации изделий. Основные преимущества лучевой стерилизации: возможность обработки термолабильных материалов, стерилизации объектов в упакованном виде, включение стерилизации в непрерывный производственный процесс.

Следует отметить, что все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

4 Методы контроля стерильности

Отмечено появление и распространение патогенных микроорганизмов, высокорезистентных к действию факторов окружающей среды. Поэтому ужесточаются способы стерилизации и особое значение придают правильному выбору режима стерилизации и тщательному контролю ее качества.

На практике проводят контроль стерилизации, при котором о работе стерилизующих агентов и аппаратов судят по: 1) эффективности гибели спор в процессе стерилизации (биотест); 2) прямым измерением температуры; 3) с помощью химических индикаторов.

В качестве биотестов используют ампулы с лиофилизированной культурой *Bacillus stearothermophilus*.

Для контроля режима стерилизации существуют и разрабатываются новые диагностикумы. Примером такого диагностикума могут служить суспензии спор термоустойчивого микроорганизма в питательной среде, содержащей рН-индикатор, который служит для определения метаболической активности культуры. В качестве физических методов используют вещества, имеющие определенную точку плавления, например, бензонафтол – температура плавления 110 °С, резорцин и серу – 119 °С, бензойную кислоту – 120 °С. При испытании одно из названных веществ помещают в трубку, размером 0,5 x 6 см, запаивную с одного конца, прибавляют немного сухого анилинового красителя (фуксин, сафранин, малахитовый зеленый) и запаивают. Несколько таких трубок помещают в автоклав между стерилизуемыми предметами. Если температура в автоклаве достаточно высока, вещество расплавится и в результате окрасится в цвет, соответствующий взятому красителю.

5 Методы поддержания (хранения) культур микроорганизмов

Основная задача хранения культур – поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и производства. Проблема длительного хранения микроорганизмов сводится к торможению процессов обмена веществ. Хранение микроорганизмов осуществляется в специальных коллекциях типовых культур. В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими пересевами (субкультивированием); 2) под минеральным маслом; 3) высушиванием; 4) лиофилизацией; 5) в условиях низких и ультранизких температур.

Субкультивирование – традиционный метод хранения культур (чаще всего аспорогенных) и заключается он в пересевах культур на свежие питательные среды один–два раза в месяц. Между пересевами микроорганизмы хранят в темноте при температурах 5–20 °С. При использовании этого метода хранения культур должны быть соблюдены три условия: 1) подходящая поддерживающая среда; 2) идеальная температура хранения; 3) необходимая частота пересевов. Преимуществом метода является простота и удобный визуальный контроль за чистотой культуры или ее морфологической изменчивостью, а к недостаткам следует отнести возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов.

Хранение под минеральным маслом заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла (0,5–1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов и предохраняет поверхность среды от высыхания. Такие культуры хранят в холодильнике. Большинство сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение 8–14 лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересеваяют через 2–3 года. Хранение под маслом имеет следующие преимущества: относительно длительное сохранение стабильности свойств микроорганизмов, сокращение затрат на пересевы, метод не требует специального оборудования.

Высушивание – простейший метод хранения микроорганизмов, в процессе которого происходит обезвоживание микробных клеток. В высушенных (до остаточной влажности 10–12 %) клетках

биохимические реакции приостанавливаются или протекают очень медленно. Процесс высушивания лучше переносят спорообразующие виды. Широко применяют воздушное высушивание микроорганизмов на различных адсорбентах: в стерильной почве, песке, глине, фильтровальной бумаге, стеклянных бусах, крахмале и т. д. Адсорбенты защищают микроорганизмы от пересыхания, связывают свободную воду и поддерживают определенный уровень влажности. Разновидностью метода является *L*-высушивание, или высушивание из жидкого состояния: микроорганизмы в суспензионной среде высушивают под вакуумом в стеклянных ампулах, погруженных в водяную баню с контролируемой температурой. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать, они широко используются для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, бактериальных удобрений, энтомопатогенных препаратов.

Лиофилизация заключается в удалении воды из замороженных суспензий под вакуумом, т. е. при этом вода испаряется, минуя жидкую фазу. Этот метод считается одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения микроорганизмов. При его использовании многие разнородные группы бактерий и бактериофагов сохраняются в жизнеспособном состоянии 30 и более лет. Выживаемость лиофилизированных клеток зависит от специфических особенностей вида и штамма, стадии роста и концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий реактивации. При подготовке клеток к лиофилизации их концентрированную суспензию (10^9 – 10^{10} кл/мл) переносят в среду, содержащую протекторы: сыворотку крови, желатин, молоко, полиэтиленгликоль и др. и затем по 0,2 мл помещают в специальные ампулы. Для лиофилизации используют различные аппараты, простейшим из которых является эксикатор, который охлаждают, чтобы клеточная суспензия во время подключения к вакууму оставалась замороженной. Длительность замораживания – высушивания – 5–6 часов. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят при 4 °С в темноте. После лиофилизации для выведения клеток из состояния анабиоза создают условия, снижающие осмотический шок, возникающий при вскрытии ампул. Лучшее восстановление свойств происходит на богатых натуральных средах.

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах используется в тех случаях, когда культуры не выдерживают лиофилизации (спирохеты, микоплазмы, различные вирусы). Микроорганизмы замораживают либо в рефрижераторах (от

– 12 °С до – 80 °С) либо используют рефрижераторы с азотом (от – 150 °С до – 196 °С). При хранении бактерий в жидком азоте используют криопротекторы двух типов: 1) глицерин и диметилсульфоксид, которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутри-, так и внеклеточную защиту; 2) сахароза, глюкоза, полиэтиленгликоль обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. По 0,4 мл суспензии клеток (10^8 кл/мл) разливают в специальные ампулы, которые запаивают. Далее проводят двухэтапное охлаждение: с медленной (снижение температуры 1 °С/мин) и быстрой (снижение температуры 15–30 °С/мин) скоростью. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают при 37 °С. К основным преимуществам криогенного сохранения микроорганизмов можно отнести: малую вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, небольшие временные и материальные затраты, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята.

Сравнительный анализ использования различных методов хранения культур микроорганизмов приведен в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Время выживания бактерий при различных методах хранения

Род бактерий	Частота пересевов, месяцы	Время выживания, годы				
		Под минеральным маслом	В стерильной почве	При замораживании	После лиофилизации	В жидком азоте
<i>Actinomyces</i>	1	–	1 – 2	2 – 3	>30	>30
<i>Bacillus</i>	2 – 12	1	1 – 2	2 – 3	>30	>30
<i>Bifidobacterium</i>	Еженед.	–	–	–	>30	>30
<i>Clostridium</i>	6 – 12	1 – 2	–	2 – 3	>30	>30
<i>Escherichia</i>	1 – 4	1 – 2	–	–	>30	>30
<i>Erwinia</i>	1 – 4	1 – 2	–	–	>30	>30
<i>Neisseria</i>	1	1	–	1 – 2	>30	>30
<i>Nocardia</i>	1 – 4	1	–	1 – 2	>30	>30
<i>Pseudomonas</i>	1 – 3	–	–	1	>30	>30
<i>Streptococcus</i>	1 – 2	1	–	–	>30	>30
<i>Streptomyces</i>	1 – 8	1 – 2	2 – 3	1 – 3	>30	>30

Примечание: «–» – нет данных

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите общие правила работы в учебной микробиологической лаборатории.
- 2 Дайте определения понятий асептика, антисептика, дезинфекция, стерилизация.
- 3 Перечислите и охарактеризуйте основные методы термической и холодной стерилизации.
- 3 Перечислите методы поддержания культур микроорганизмов в коллекциях, охарактеризуйте их.

Практическое занятие 1

Цель: ознакомление с методами стерилизации и методами хранения культур микроорганизмов.

Материалы и оборудование: пинцеты, бактериальные петли и шпатели, пробирка со спиртом, колбы и пробирки с ватными пробками, чашки Петри, предметные стекла, пипетки, вата, полоски бумаги, бумага, держатели, спиртовки, спички.

Ход работы

- 1 Ознакомиться с правилами работы и техникой безопасности в учебной микробиологической лаборатории.
- 2 Ознакомиться с методами стерилизации.
- 3 Подготовить к стерилизации сухим жаром: чашки Петри (по 3 шт. в пачке); пипетки; пробирки. Посуду и инструменты простерилизовать в сушильном шкафу при 165–170 °С в течение 3 ч.
- 4 Приготовить ватно-марлевые пробки для нескольких пробирок и колб разного размера.
- 5 Отработать приемы прокаливания и обжигания в пламени инструментов (бактериальные петли, шпатели, ножницы, пинцеты).
- 6 Отработать приемы прокаливания и обжигания в пламени предметных стекол.
- 7 Охарактеризовать способы стерилизации согласно схеме таблицы 1.3. Записать в рабочую тетрадь.

Таблица 1.3 – Способы стерилизации материала

№ п/п	Стерилизуемый материал	Метод стерили- зации	Примечание (в каком виде, в каких сосудах и т.д.)
1	Питательные жидкие среды, не содержащие сахара, разлагающихся при 120 °С и выше		
2	Питательные плотные среды, содержащие сахара, разлагающихся при 120 °С		
3	Сыпучие среды (жмых, отруби, зерно)		
4	Растворы витаминов, антибиотиков		
5	Молоко, соки, сиропы, пиво, вино		
6	Чашки Петри (стеклянные), пипетки, шпателя		
7	Чашки Петри из термолabileйной пластмассы		
8	Наконечники из термостойкой пластмассы		
9	Вазелиновое масло, глицерин, тальк		
10	Растительный материал (корни, плоды и др.)		

8 Используя сведения п. 5 настоящего практического пособия и данные таблицы 1.2, заполнить таблицу 1.4.

Таблица 1.4 – Преимущества и недостатки различных методов хранения культур микроорганизмов

Методы хранения культур микроорганизмов	Преимущества	Недостатки	Группы микро- организмов	Время выживания, годы
Субкультивирование				
Хранение под минеральным маслом				
Высушивание				
Лиофилизация				
Хранение при ультранизких температурах				

Тема 2 Способы культивирования микроорганизмов

- 1 Понятие о культивировании микроорганизмов
- 2 Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов
- 3 Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды
- 4 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

1 Понятие о культивировании микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, сильно зависит от физических и химических факторов (температуры, кислотности, аэрации, света и т. д.). При этом количественные показатели каждого из них неодинаковы и определяются особенностями метаболизма каждой группы бактерий. Можно выделить методы культивирования на твердых и в жидких питательных средах; в аэробных, анаэробных и микроаэрофильных условиях. Характеристики этого процесса устанавливают путем измерения таких показателей как число клеток или их биомасса.

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют различными методами.

Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется **посевом**, или **инокуляцией**. Посев микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Перед посевом следует сделать надписи на посуде. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей или иглой, если микроорганизмы выращивали на плотной среде. В случае, когда микроорганизмы выращены в жидкой среде, лучше пользоваться пипеткой. После пересева пробирки или другие сосуды с микроорганизмами помещают в термостаты с определенной температурой.

По окончании работы посуду с культурами микроорганизмов, подлежащими выбрасыванию, следует автоклавировать, чтобы убить клетки, и только после этого мыть. Допускается заливать

дезинфицирующим раствором поверхность плотных сред. Через сутки среды можно выбрасывать и посуду мыть. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

2 Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов

Культивирование аэробных микроорганизмов проводят следующим образом:

1) На поверхности плотных сред или в тонком слое жидких сред, когда микроорганизмы получают кислород прямо из воздуха.

2) В жидких средах (глубинное культивирование). В этом случае микроорганизмы используют растворенный в среде кислород. В связи с низкой растворимостью кислорода, для обеспечения роста аэробных бактерий в толще среды, требуется постоянное аэрирование. Наиболее простой и широко используемый в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на шейкерах, обеспечивающих встряхивание колб или пробирок со скоростью 100–200 об/мин и более. Помимо перемешивания, аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием под давлением через толщу среды стерильного воздуха.

Граница между аэробными и анаэробными микроорганизмами является относительно условной. Хотя **облигатными анаэробами** обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода, на практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении. **Аэротолерантные бактерии** хорошо растут на поверхности агара и чашках при низком уровне кислорода. Степень анаэробии измеряется по окислительно-восстановительному (редокс, Eh) потенциалу среды. При увеличении Eh выше 100 мВ, обусловленном присутствием растворимого кислорода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. Для удаления кислорода и создания соответствующих условий среды можно воспользоваться следующими методами:

1 **Культивирование в микроанаэроstate** – аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот с 5 % CO₂ и 10 % H₂.

2 Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород. В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой, а также анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

3 Использование восстанавливающих агентов, которые добавляют для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота. Удаления кислорода из среды можно добиться и в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслоить смесь (1:1) масла и парафина, то в подобных условиях будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов.

4 Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями. В жидкой среде с восстанавливающими агентами перед инокуляцией анаэроба проводят культивирование, например, *E.coli*, что приводит к удалению из среды остаточного кислорода. Перед инокуляцией анаэробов клетки *E.coli* убивают нагреванием.

Существует и другая модификация метода. На половине чашки Петри засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется после полного использования кислорода аэробом.

Для культивирования анаэробных бактерий используют и другие методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;
- культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в среду уменьшается с увеличением ее плотности;
- заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

3 Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды

Посев микроорганизмов обычно осуществляется бактериологической петлей. Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку таким образом, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают наружный конец ватной пробки к ладони и вынимают пробку из пробирки. Края открытой пробирки слегка обжигают в пламени горелки, вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, ватную пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе. Оставшиеся на петле после пересева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. В этом случае прокалывание петли начинают с участка проволоки, ближе к основанию держателя, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсохли и не образовали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводят в вертикальное положение, прокалывают докрасна и только после этого ставят на место.

4 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

Посев на *скошенный агар* в пробирках проводят следующим образом. Клетки микроорганизмов отбирают бактериологической петлей (как описано в п. 3) и вводят петлю в пробирку со скошенной агаризованной средой почти до дна. Слегка прикасаясь петлей к поверхности среды, проводят от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих.

Посев на *поверхность агаризованной среды в чашках Петри* можно производить с помощью бактериологической петли, микробиологического шпателя или методом реплик. При посеве

петлей отбирают клетки микроорганизмов с агаризованной или жидкой среды, приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхности среды проводят штрихи, после чего чашку закрывают и помещают в термостат крышкой вниз.

При посеве микроорганизмов *из жидкой среды с использованием микробиологического шпателя* поступают следующим образом. Для этого вынимают пипетку за верхний конец из бумаги, насаживают резиновую грушу. На поверхность среды в чашке наносят с помощью стерильной пипетки заданный объем жидкой культуры. Одновременно вращая чашку и проводя круговые движения стерильным шпателем, суспензию распределяют по поверхности среды. После использования пипетку немедленно переносят в дезинфицирующий раствор (хлорамина, фенола), не касаясь ею окружающих предметов.

При пересеве микроорганизмов *методом реплик* используют стерильные кусочки бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на специальный столик для реплик, диаметр которого меньше диаметра чашки Петри, и закрепляют металлическим кольцом. Чашки Петри с питательной средой и сформировавшимися колониями микроорганизмов накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают. Чашку осторожно снимают, а бархат с отпечатками колоний после этого может служить исходным штампом для засева других чашек со средой. Возможно снятие отпечатков на серию чашек, содержащих различные среды. В качестве контроля в последнюю очередь производится отпечаток на чашку с исходной питательной средой.

При *глубинном посеве* микроорганизмов в агаризованную питательную среду ее предварительно разливают по 15–20 мл в пробирки и стерилизуют. После охлаждения расплавленной среды до 48–50 °С в каждую пробирку стерильной пипеткой вносят по 0,1–1,0 мл жидкой культуры микроорганизмов. При необходимости готовят серию разведений культуры микроорганизмов с таким расчетом, чтобы при высеве получить изолированные колонии. Содержимое пробирки перемешивают путем ее вращения между ладонями и быстро выливают в чашку Петри. После застывания среды чашки помещают в термостат.

В некоторых особых случаях используют выращивание бактерий в *полужидких средах*. Такая среда пригодна для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1–0,4 % агара, гелеобразующие

вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей, микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы начинают расти в нижней части полужидкой среды.

Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки, по возможности быстро, чтобы не загрязнять культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около проводящего посев, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного загрязнения культуры.

Вопросы для самоконтроля

1 Дайте общее представление о культивировании микроорганизмов.

2 Каково отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду?

2 Перечислите способы культивирования аэробных микроорганизмов.

3 Перечислите способы культивирования анаэробных микроорганизмов.

Практическое занятие 2

Цель: ознакомление со способами культивирования микроорганизмов, техникой посева на (в) питательные среды.

Материалы и оборудование: бактериальные петли (иглы), бактериальные шпатели, стакан со спиртом, колбы (пробирки) с ватными пробками, чашки Петри, стерильные пипетки, спиртовки, спички.

Ход работы

1 Отработать приемы посева плотной культуры клеток с одной пробирки (колбы), закрытых ватными пробками, в другую; с одной чашки Петри – в другую.

2 Отработать приемы посева жидкой культуры клеток с одной пробирки (колбы), закрытых ватными пробками, в другую, либо в чашку Петри.

3 Нарисовать в рабочей тетради схему распределения прокариот в зависимости от их отношения к молекулярному кислороду.

4 Ознакомиться со способами культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов, записать их в рабочей тетради.

5 Охарактеризовать рост бактерий в жидкой среде с различным отношением к молекулярному кислороду в соответствии с рисунком 2.1. Рисунок зарисовать в рабочую тетрадь и соответственно подписать группы прокариот в зависимости от отношения к молекулярному кислороду.

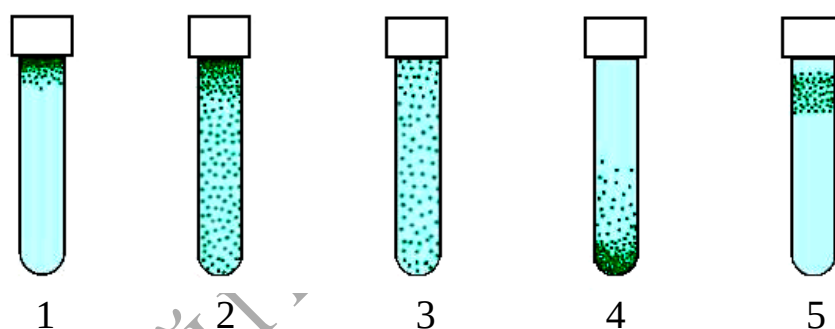


Рисунок 2.1 – Иллюстрация роста бактерий в жидкой среде с различным отношением к O_2

Тема 3 Микроскопические методы исследования в микробиологии: устройство микроскопа и основные приемы микроскопирования живых микроорганизмов

- 1 Особенности разных видов микроскопии
- 2 Устройство светлопольного микроскопа
- 3 Правила работы с иммерсионным объективом
- 4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов

1 Особенности разных видов микроскопии

Основными задачами микроскопии являются следующие:

- Выявление микроорганизмов в различных материалах.
- Ориентировочная идентификация микроорганизмов в образце.
- Изучение некоторых морфологических признаков и структур микроорганизмов (например, капсул, жгутиков и т. д.).
- Изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

На сегодняшний день наиболее используемой является световая микроскопия.

Световая микроскопия обеспечивает увеличение до 2–3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст).

Основными характеристиками любого микроскопа являются разрешающая способность и контраст. **Разрешающая способность** – это минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм. **Контраст изображения** – это различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3–4 %, то его невозможно уловить ни глазом, ни фотопластинкой; тогда изображение останется невидимым, даже если микроскоп разрешает его детали. На контраст влияют как свойства объекта, изменяющие световой поток по сравнению с

фоном, так и способности оптики уловить возникающие различия в свойствах луча. Возможности светового микроскопа ограничены волновой природой света. Физические свойства света – цвет (длина волны), яркость (амплитуда волны), фаза, плотность и направление распространения волны изменяются в зависимости от свойств объекта. Эти различия и используются в современных микроскопах для создания контраста.

Увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. У типичных исследовательских микроскопов увеличение окуляра равно 10, а увеличение объективов – 10, 40 и 100. Соответственно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1 000. Некоторые из микроскопов имеют увеличение до 2 000. Еще более высокое увеличение не имеет смысла, так как при этом разрешающая способность не улучшается. Напротив, качество изображения ухудшается.

Числовая апертура используется для выражения разрешающей способности оптической системы. Числовая апертура – это оптический «охват» линзы, она является мерой количества света, попадающего в линзу. Числовая апертура объектива указана на его оправе. Апертура конденсора должна соответствовать числовой апертуре объектива. Числовая апертура любой линзы, граничащей с воздухом (т.е. «сухой системы»), не может превысить 1, так как показатель преломления воздуха равен 1. Числовую апертуру можно повысить, если увеличить показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом, приблизив его к показателю преломления стекла (1,5). Для этого между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом помещают каплю жидкости с показателем преломления большим, чем показатель преломления воздуха, например, каплю воды ($n = 1,3$), глицерина ($n = 1,4$) или кедрового (иммерсионного) масла ($n = 1,5$). Для каждой из указанных выше жидкостей выпускаются специальные объективы, которые называются иммерсионными.

Световая микроскопия включает обычную *просвечивающую микроскопию (светло-, темнопольную), фазово-контрастную, люминесцентную*. В последнее время разработаны и другие способы микроскопии и микроскопы – *инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия*.

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете в светлом поле. Данный вид микроскопии

предназначен для исследования морфологии, размеров клеток, их взаимного расположения, структурной организации клеток и других особенностей. У светового микроскопа максимальная разрешающая способность составляет 0,2 мкм, что обеспечивает высокоточное увеличение микроскопа до 1500х.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет более четко наблюдать живые прозрачные объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды. Действие фазово-контрастного микроскопа основано на интерференции света в плоскости изображения, обусловленной сдвигом по фазе (при использовании фазового кольца в апертурной диафрагме). При фазово-контрастной микроскопии часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики – инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху.

С помощью фазово-контрастной микроскопии изучают форму, размеры, взаимное расположение клеток, их подвижность, размножение, прорастание спор микроорганизмов и т. д. Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст).

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Такое освещение препарата достигается использованием специального темнопольного конденсора. Темнопольная микроскопия является очень простым, но эффективным методом и хорошо подходит для получения изображения живых и неокрашенных биологических образцов. Учитывая простоту установки, качество получаемых изображений весьма хорошее.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, что находится за пределами разрешающей способности обычного светопольного микроскопа. Однако наблюдение за объектами в темном поле позволяет исследовать только контуры клеток и не дает возможности рассмотреть их внутреннюю структуру.

Люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей светиться при их освещении невидимым

ультрафиолетовым или синим светом. При использовании ультрафиолетового света разрешающая способность микроскопа может достигать 0,1 мкм.

Клетки микроорганизмов обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, примулин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500–1:100 000. Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава, клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и люминесцируют различным образом. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это позволяет использовать данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток и т. д.

Электронная микроскопия позволяет обнаружить объекты, которые не разрешаются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Теоретически **разрешение просвечивающего электронного микроскопа** составляет 0,002 нм; реальное разрешение современных **электронных микроскопов** приближается к 0,1 нм. На практике разрешение для биологических объектов достигает 2 нм.

Короткая длина волны электронов позволяет различить объекты размером 0,5–1,0 нм. В современных электронных микроскопах на экране достигается увеличение 5000– 200 000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих бактерию и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект получил название **негативного контрастирования**.

Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют **просвечивающим (или трансмиссионным)**.

В **сканирующем электронном микроскопе (растровая электронная микроскопия (РЭМ))** пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое формирует изображение на светящемся экране. Для РЭМ характерны высокая разрешающая способность, большой диапазон увеличений (до 100 000 и выше), большая глубина фокусировки (~100 мкм),

многообразие режимов работы. Сканирующий микроскоп дает картину поверхностей и позволяет получать трехмерное изображение.

Лазерная конфокальная микроскопия дает возможность получить отчетливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. Данный метод пригоден лишь для исследования самосветящихся (флуоресцентных) объектов. При сочетании с компьютерной техникой возможна пространственная реконструкция изучаемого объекта. В конфокальном лазерном сканирующем микроскопе изображения внутренних сечений формируются за счет сканирования сфокусированным лазерным пучком от разных (405, 488, 532, 635 нм) лазеров и пространственной фильтрации излучения. При использовании сканирующей микроскопии ближнего поля (СМБП) достигается высокая разрешающая способность. Наименьший размер элемента, полученного с помощью СМБП, составляет 20 нм при длине волны света 0,486 нм. В изображении контролируемого элемента отсутствуют дифракционные или интерференционные эффекты, затрудняющие определение его границ. Отличительной особенностью СМБП по сравнению с атомно-силовым микроскопом является чувствительность к оптическим характеристикам поверхности контролируемого образца, длине волны света, люминесценции и др.

Компьютерная интерференционная микроскопия позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур; во многих случаях применяется для изучения живых клеток. Принцип действия автоматизированного интерференционного микроскопа основан на интерференции световых пучков лазерного излучения, отраженного от опорного зеркала и зеркала, на котором помещен измеряемый фазовый объект. Теоретически предельно достижимая разрешающая способность может составить в среднем 0,2 нм, практически она составляет 0,4 мкм.

Рентгеновская компьютерная томография (РКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) позволяют наблюдать объекты в обычных условиях.

2 Устройство светлопольного микроскопа

Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов. Подобные микроскопы позволяют

определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также способность микроорганизмов к дифференцирующему окрашиванию.

Успех наблюдения объекта и надежность получаемых результатов зависят от хорошего знания оптической системы микроскопа.

Рассмотрим устройство и внешний вид биологического микроскопа, модель XSP-136 (Ningbo teaching instrument Co., LTD), работу его составных частей. Микроскоп имеет механическую и оптическую части (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Устройство и внешний вид микроскопа

Механическая часть биологического микроскопа включает штатив с предметным столиком; бинокулярную насадку; рукоятку грубой настройки на резкость; рукоятку точной настройки на резкость; рукоятки перемещения предметного столика вправо/влево, вперед/назад; револьверное устройство.

Оптическая часть микроскопа включает осветительный аппарат, конденсор, объективы и окуляры.

Описание и работа составных частей микроскопа

Объективы. Объективы (тип ахроматы), входящие в комплект микроскопа, рассчитаны на механическую длину тубуса микроскопа

160 мм, линейное поле зрения в плоскости изображения 18 мм и толщину покровного стекла 0,17 мм. На корпусе каждого объектива нанесено линейное увеличение, например, 4х; 10х; 40х; 100х и, соответственно, указана числовая апертура 0,10; 0,25; 0,65; 1,25, а также цветовая маркировка.

Биноклярная насадка. Биноклярная насадка обеспечивает визуальное наблюдение изображения объекта; устанавливается в гнездо штатива и закрепляется винтом.

Установка расстояния между осями окуляров в соответствии с глазной базой наблюдателя осуществляется разворотом корпусов с окулярными тубусами в диапазоне от 55 до 75 мм.

Окуляры. В комплект микроскопа входят два широкоугольных окуляра с увеличением 10х.

Револьверное устройство. Четырехгнездное револьверное устройство обеспечивает установку объективов в рабочее положение. Смена объективов производится вращением рифленого кольца револьверного устройства до фиксированного положения.

Конденсор. В комплект микроскопа входит конденсор светлого поля Аббе с ирисовой диафрагмой и фильтром, числовая апертура $A=1,25$. Конденсор устанавливается в кронштейн под предметным столиком микроскопа и закрепляется винтом. В конденсоре светлого поля имеется ирисовая апертурная диафрагма и откидная оправа для установки светофильтра.

Осветительное устройство. Для получения равномерно освещенного изображения объектов в микроскопе имеется осветительное светодиодное устройство. Включение осветителя осуществляется с помощью выключателя, расположенного на задней поверхности основания микроскопа. Вращая диск регулировки накала лампы, расположенный на боковой поверхности основания микроскопа слева от наблюдателя, можно изменять яркость освещения.

Фокусировочный механизм. Фокусировочный механизм расположен в штативе микроскопа. Фокусирование на объект производится перемещением по высоте предметного столика вращением рукояток, расположенных по обеим сторонам штатива. Грубое перемещение осуществляется рукояткой большего размера, точное перемещение – рукояткой меньшего размера.

Предметный столик. Предметный столик обеспечивает перемещение объекта в горизонтальной плоскости. Диапазон перемещения столика равен 70х30 мм. Объект крепится на

поверхности столика между держателем и прижимом препаратоводителя, для чего прижим отводится в сторону.

Работа с микроскопом

Перед началом работы с препаратами необходимо правильно настроить освещение. Это позволяет добиться максимального разрешения и качества изображения микроскопа. Для работы с микроскопом следует отрегулировать раскрытие окуляров таким образом, чтобы два изображения слились в одно. Кольцо диоптрийной коррекции на правом окуляре следует установить «на ноль», если острота зрения обоих глаз одинакова. В противном случае необходимо выполнить общую наводку на резкость, после чего закрыть левый глаз и добиться максимальной резкости для правого, вращая кольцо коррекции.

Исследование препарата рекомендуется начинать с объектива наименьшего увеличения, который используется в качестве поискового при выборе участка для более подробного изучения, затем можно переходить к работе с более сильными объективами.

Убедитесь в том, что объектив 4х готов к работе. Это поможет вам установить предметное стекло на место, а также разместить объект для исследования. Поместите предметное стекло на предметный столик и осторожно зажмите его при помощи пружинных держателей.

Подсоедините сетевой шнур и включите микроскоп.

Всегда начинайте исследование с объективом 4х. Для достижения четкости и резкости изображения исследуемого объекта используйте рукоятки грубой и точной фокусировки. Если при помощи слабого объектива 4х было получено желаемое изображение, поверните револьверное устройство на следующее большее значение 10х. Револьвер должен зафиксироваться в нужном положении.

Наблюдая за объектом в окуляр, поверните рукоятку (большого диаметра) грубой фокусировки. Чтобы получить наиболее четкое изображение используйте рукоятку (маленького диаметра) четкой фокусировки.

Чтобы контролировать поток света, проходящего через конденсор, можно открыть или закрыть ирисовую диафрагму, расположенную под предметным столиком. Изменяя настройки, можно добиться наиболее четкого изображения исследуемого объекта.

Во время фокусировки не следует допускать соприкосновения объектива с объектом исследования. При увеличении объектива до 100х объектив располагается очень близко к предметному стеклу.

Правила обращения и ухода за микроскопом

1 Микроскоп необходимо содержать в чистоте и предохранять от повреждений.

2 Для сохранения внешнего вида микроскопа, его необходимо периодически протирать мягкой салфеткой, слегка пропитанной бескислотным вазелином, предварительно удалив пыль, а затем вытирать сухой мягкой чистой салфеткой.

3 Металлические детали микроскопа необходимо содержать в чистоте. Для чистки микроскопа следует использовать специальные смазочные некоррозирующие жидкости.

4 Для предохранения оптических деталей визуальной насадки от пыли необходимо оставлять окуляры в окулярных тубусах.

5 Нельзя касаться пальцами поверхностей оптических деталей. В случае если на линзу объектива попала пыль, ее следует удалить пыль при помощи вентилятора или кисточки. В случае если пыль проникла внутрь объектива и на внутренних поверхностях линз образовался мутный налет, необходимо отправить объектив для чистки в оптическую мастерскую.

6 Во избежание нарушения юстировки необходимо предохранять микроскоп от толчков и ударов.

7 Во избежание попадания пыли на внутреннюю поверхность линз микроскоп необходимо хранить под чехлом или в упаковке.

8 Не следует самостоятельно разбирать микроскоп и его составные для устранения неисправностей.

Меры безопасности

При работе с микроскопом источником опасности является электрический ток. Конструкция микроскопа исключает возможность случайного соприкосновения к токоведущим частям, находящимся под напряжением.

Не рекомендуется оставлять включенный в сеть микроскоп без присмотра. После окончания работы микроскоп необходимо отключать от сети.

3 Правила работы с иммерсионным объективом

При работе с масляным иммерсионным объективом следует соблюдать определенные правила. Для проведения исследования при помощи объектива 100х все образцы следует закрывать покровными стеклами. На сухой фиксированный окрашенный препарат наносят каплю иммерсионного масла. Устанавливают объектив 100х и, глядя

сбоку, осторожно поднимают предметный столик микроскопа до погружения линзы объектива в масло. Следят за тем, чтобы фронтальная линза объектива не коснулась покровного стекла. Затем, наблюдая в окуляр, макровинтом медленно опускают предметный столик и фокусируют объектив. Тонкую фокусировку осуществляют с помощью микрометрического винта.

По окончании микроскопирования опускают предметный столик, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой или фильтровальной бумагой, а затем салфеткой, слегка смоченной очищенным бензином. Нельзя оставлять масло на поверхности линзы, так как на нем фокусируется пыль, что может со временем привести к повреждению оптики объектива. Эффективен способ удаления масла как жидкого, так и застывшего, свежоотломленным пенопластом. В отдельных случаях помогает протирка тканью, смоченной дистиллированной водой. Края линз с выступающей оправой очищают с помощью палочки, обернутой тканью.

4 Приемы микроскопирования живых микроорганизмов

Нативные (прижизненные) препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространенными являются методы «висячей капли», «раздавленной капли», «отпечаток», «агаровая пленка», микрокамеры с плотными средами. Препараты живых клеток обычно рассматривают с «сухими» системами микроскопа. Для прижизненного изучения бактерий часто используют фазово-контрастную и темнопольную микроскопию.

Морфологическое разнообразие бактерий можно изучить при приготовлении негативного тушевого препарата, когда окрашивают суспензию тушью. В поле зрения микроскопа на общем темном фоне туши отчетливо видны неокрашенные клетки микроорганизмов различной формы, разных размеров, расположенные в разнообразных сочетаниях.

Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды, помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Для этого покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее. Микроорганизмы,

выращенные на плотной или в жидкой питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей; выращенные в жидкой среде – переносят стерильной пипеткой. В последнем случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы из-под покровного стекла не выступал избыток жидкости. Если он образовался, его необходимо удалить фильтровальной бумагой. Препарат можно микроскопировать с использованием иммерсионной системы.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей или обычным пером наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. При работе с бактериями этот метод используется редко.

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой растут микроорганизмы, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего (1 : 40) на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом. Препарат «отпечаток» используют в основном при исследовании спороношения стрептомицетов.

Препарат «микрокультура» (или «агаровая пленка»). На тонкое, простерилизованное и нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,2–0,3 мл горячей агаризованной питательной среды и распределяют ее по всей поверхности стекла. После застывания среды удаляют петлей лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов бактериальной петлей или пипеткой наносят каплю жидкой культуры или суспензии клеток микроорганизма. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку с выросшей микрокультурой наносят

каплю красителя или каплю воды в случае подсыхания пленки, и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Выращивание микроорганизмов непосредственно на предметном стекле позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами их роста и развития, изучать цикл развития, способ размножения (деление-почкование), влияние на эти процессы каких-либо агентов. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей микроколони. Выращивание микроколони можно проводить в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом, загерметизированном лаком) условиях.

Агаровую пленку можно нанести на покровное стекло и приготовить препарат «висячая капля». На таком препарате можно наблюдать движение бактерий по типу скольжения. **Движение бактерий** за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя в большинстве случаев светлполюный микроскоп. Наиболее эффективно наблюдение за подвижностью в темнопольном микроскопе.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите основные задачи микроскопии.
- 2 Охарактеризуйте следующие виды микроскопии: светлполюная, фазово-контрастная, темнопольная, люминесцентная, электронная, сканирующая, компьютерная интерференционная.
- 3 Каково устройство светлполюного микроскопа?
- 4 В чем сущность иммерсионного метода микроскопирования?
- 5 Охарактеризуйте способы приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов.

Практическое занятие 3

Цель: ознакомление с особенностями разных видов микроскопии, изучение устройства светлполюного микроскопа; овладение методом иммерсионного микроскопирования; ознакомление с приемами микроскопирования живых клеток микроорганизмов.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, предметные и покровные стекла, спиртовки, спички, бактериальные петли, иммерсионное масло, стерильные медицинские пипетки, пинцеты, палочки ватные гигиенические, фильтровальная бумага,

пенициллиновые бутылочки со стерильной водопроводной водой, ванночки, мостики, немытые фрукты или овощи, суспензия гороха (либо настои мяса, рыбы, овощей и др.).

Ход работы

1 Ознакомиться с основными задачами микроскопии.

2 Используя материал, представленный в п. 2 данного руководства, ознакомиться с различными видами микроскопии. Выяснить их особенности по схеме таблицы 3.1, записать в рабочую тетрадь.

Таблица 3.1 – Особенности различных видов микроскопии

Виды микроскопии	Источник света, принцип получения изображения	Максимальная(ое)		Область применения
		разрешающая способность	увеличение микроскопа	
1 Светлопольная				
2 Темнопольная				
3 Фазово-контрастная				
4 Люминесцентная				
5 Электронная				
6 Сканирующая световая				
7 Сканирующая электронная				
8 Компьютерная интерференционная				
9 Лазерная конфокальная				

3 Изучить устройство светлопольного микроскопа, используя описание в п. 3 методического руководства и рассматривая микроскоп.

4 Ознакомиться с сущностью иммерсионного метода микроскопирования, его преимуществом при работе с микроорганизмами, правилами пользования иммерсионным объективом.

5 Охарактеризовать светлопольный микроскоп по схеме таблицы 3.2. Записать в рабочую тетрадь.

Таблица 3.2 – Устройство микроскопа биологического

Параметры, свойства	Характеристика микроскопа
Микроскоп биологический состоит из следующих двух частей:	
Увеличение окуляров	
Увеличение объективов	
Увеличение микроскопа: а) минимальное; б) максимальное	
Оформление оправы иммерсионного масляного объектива	
Увеличение иммерсионного объектива	
Сущность иммерсионного метода микроскопирования	
Правила ухода за иммерсионным объективом	

6 Ознакомиться с различными приемами микроскопирования живых микроорганизмов.

7 Приготовить препараты по методу «раздавленная капля» из различных объектов: смыва фруктов, стола, рук, различных настоев, пользуясь описанием методики, изложенной в п. 5 данного руководства.

8 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Определить форму и сочетание клеток, подвижность. Выполнить зарисовки.

9 Все наблюдения и рисунки отметить в таблице 3.3. Под рисунком указать увеличение микроскопа.

10 Указать в выводах степень наблюдаемого разнообразия прокариот; преимущества и недостатки использования в работе прижизненных препаратов.

Таблица 3.3 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Состав среды, объект исследования	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Подвижность	
Рисунок клеток	
Выводы:	

Тема 4 Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и изучение морфологии клеток

- 1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов
- 2 Схематичное строение бактериальной клетки
- 3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов
- 4 Простые и сложные методы окраски

1 Морфология и размеры клеток микроорганизмов

Морфологические типы бактерий, в сравнении с высшими организмами, немногочисленны. Клетки большинства бактерий имеют следующие три формы: сферическую, цилиндрическую или извитую, но существует небольшая группа мицелийобразующих форм, нитчатых бактерий и бактерий, образующих выросты. В соответствии с этим все бактерии по форме подразделяют на следующие группы.

Кокки (сферические клетки) могут быть одиночными (микрোকки), парными (диплококки, например, нейссерия); тетракокки, располагающиеся по 4 в форме квадратов; пакетобразные кокки, располагающиеся «этажами» (сарцины); располагающиеся цепочками (стрептококки); образующие бесформенные скопления в виде виноградных гроздьев (стафилококки). Диаметр клеток – 0,5–2 мкм.

Палочковидные бактерии – наиболее многочисленная группа, клетки представляют собой цилиндрические структуры. Размеры таких клеток сильно варьируют и могут быть от сотых долей до 5–10 мкм, чаще 1–3 мкм. Такие бактерии часто образуют пары или цепочки клеток (например, палочка сибирской язвы), но могут быть и одиночными (например, энтеробактерии).

Извитые бактерии могут быть трех типов: **вибрионы**, **спириллы** и **спирохеты**. Вибрионы – бактерии, изогнутые в виде запятой (холерный вибрион, кампилобактер); спириллы имеют несколько крупных обычно неравных завитков (возбудитель возвратного сыпного тифа); спирохеты имеют вид тонких спиралевидных клеток со множеством равных завитков и петель (возбудитель сифилиса, большая зубная спирохета, малая зубная спирохета).

Нитчатые бактерии – это цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или дисковидных клеток. Типичными представителями данных бактерий являются бактерии, окисляющие серу (роды *Beggiatoa*, *Thiotrix*).

К **мицелийобразующим** бактериям относятся истинные актиномицеты, которые имеют сильно разветвленный мицелий. У нокардий и микобактерий мицелий является временным и возникает на определенных стадиях роста. У коринеподобных бактерий клетки имеют только тенденцию к ветвлению, но при росте культуры наблюдается плеоморфизм клеток.

К **бактериям, образующим выросты**, относятся почкующиеся и стебельковые бактерии. Выросты – это выпячивания клеточного содержимого, окруженного клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной и не отделенные от клетки перегородкой. У некоторых бактерий выросты служат для размножения, у других – для прикрепления к субстрату или друг к другу.

Кроме вышеперечисленных, известны бактерии, которые не имеют клеточной стенки – **микоплазмы**. В культуре одного вида можно одновременно обнаружить сферические, эллипсовидные, грушевидные, дисковидные, разветвленные и неразветвленные нитчатые формы.

Археобактерии представляют собой группу бактерий с клеточной стенкой уникальной структуры, содержащей специфические химические соединения. Морфологически могут быть неправильной формы, сферическими, палочковидными, звездчатыми и т.д.

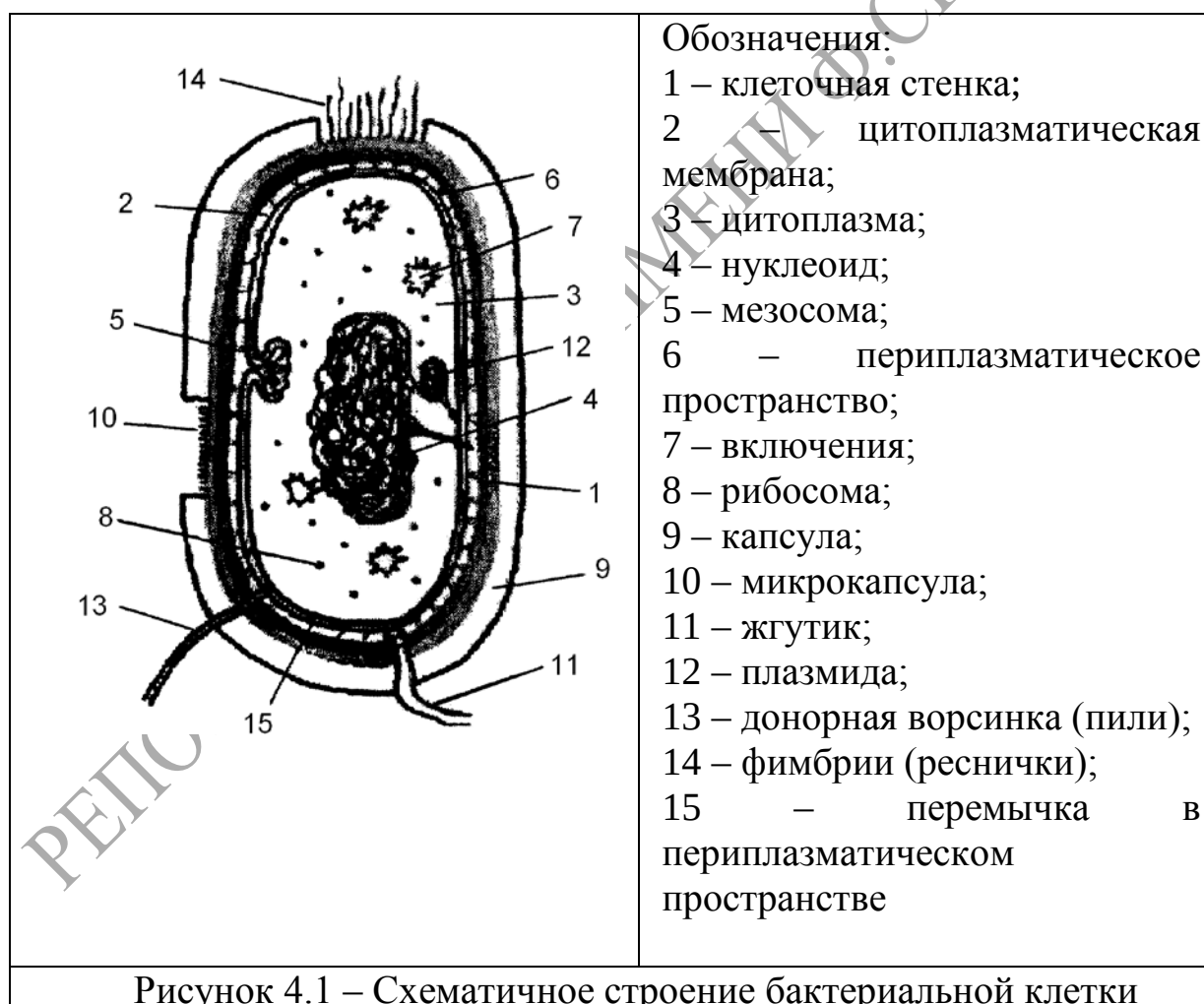
Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие плеоморфизмом. **Плеоморфизм** – это морфологическая изменчивость клеток, в зависимости от условий имеющих вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития наблюдается изменение формы клеток. Поэтому **при микроскопировании следует указывать среду культивирования, температуру культивирования, возраст культуры.**

В среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5–3,0 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; продольные размеры некоторых клеток

спирохет могут достигать 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, диаметр клеток которых составляет 0,1–0,15 мкм. Размеры клеток дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

2 Схематичное строение бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рисунок 4.1). Схематичное строение бактериальной клетки можно изобразить следующим образом:



Как и любая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. В цитоплазме расположены: нуклеоид, рибосомы, внутриплазматические

включения различной природы, могут иметься плазмиды. При впячивании цитоплазматической мембраны внутрь клетки образуются мезосомы. Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют **протопласт**, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки (фимбрии и половые пили) и т. д. Ворсинки, и жгутики обязательно связаны с цитоплазматической мембраной. По морфологии клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные.

В состав бактерий входят такие аминокислоты, углеводы, липиды и другие вещества, которые обычно не встречаются ни в клетках растений, ни в клетках животных (например, тейхоевые кислоты, пептидогликан муреин). Причем, содержание отдельных соединений существенно варьирует в зависимости от возраста бактерий, состава среды и условий культивирования.

3 Этапы и техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов

Фиксированные, окрашенные, препараты могут храниться длительное время. Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

Окрашенные препараты бактерий готовят в соответствии со следующими этапами:

- 1 подготовка материала для микроскопирования;
- 2 приготовление мазка;
- 3 высушивание и фиксация мазка;
- 4 окрашивание фиксированного мазка;
- 5 промывание препарата водой;
- 6 высушивание препарата.

Подготовка к выполнению работы

- Перед началом работы кювету с мостиком для окрашивания препарата размещают перед собой на столе ближе к правой руке.

- Спиртовку располагают напротив себя на расстоянии предплечья. Проверяют наличие спирта в спиртовке, оправляют фитиль.

- На мостик укладывают предметные стекла. **Внимание!** Стекла должны быть обезжиренными и их можно держать только за ребра. При необходимости быстро обезжирить предметное стекло можно в результате прогрева в пламени спиртовки.

- Если предстоит брать микробный материал с плотной среды, на стекло наносят каплю водопроводной воды или физиологического раствора (изотонический раствор NaCl).

- Зажигают спиртовку. **Внимание!** Горящую спиртовку нельзя переносить. **ТБ!** Нельзя низко наклоняться над спиртовкой, чтобы не поджечь волосы.

Технология приготовления фиксированного препарата-мазка

Мазки-препараты готовят из колоний бактерий и грибов, выросших на среде в чашках Петри или на поверхности исследуемых объектов (например, плоды растений), из жидких культур, жидких сред (например, вода из природных источников, смывы с поверхностей исследуемого объекта), путем получения мазков-отпечатков.

- Для приготовления препарата исследуемый материал берут из пробирки, колбы или чашки Петри бактериологической петлей или стерильной пипеткой. В некоторых случаях используют препаровальные или бактериальные иглы.

- Делают мазки на предметных стеклах, как правило, бактериальной петлей (диаметр 2 или 4 мм) из нихромовой проволоки.

- Взятый микробный материал тщательно суспензируют в капле воды или физиологического раствора на предметном стекле.

- Круговыми движениями материал равномерно распределяют на площади диаметром 1,0–1,5 см. Только при таком распределении материала в мазке можно увидеть изолированные бактериальные клетки. Если исследуемый материал содержится в жидкой среде, то петлей его наносят прямо на предметное стекло и готовят мазок.

- После приготовления мазка петлю стерилизуют в пламени спиртовки, сжигая при этом остатки микробного материала на петле.

Высушивание мазка проводят при комнатной температуре. Хорошо приготовленные тонкие мазки имеют округлую форму, быстро высыхают при комнатной температуре. Более толстые мазки

высушивают в термостате или при подогревании над пламенем спиртовки, не допуская свертывания белка бактерий и нарушения их структуры. Высушивание мазка проводят для первичного закрепления материала на стекле и для получения более качественного препарата.

Фиксация мазка чаще всего осуществляется термически (фламбированием), т. е. над пламенем горелки. Хотя данный метод фиксации и является достаточно грубым, но сохраняет морфологию и отношение бактерий к красителям. Препарат медленно проносят 2–4 раза (в течение 3–4 с) над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони вызывало легкое жжение). Более длительное нагревание может вызвать деформацию клеточных структур. Фиксация мазка преследует следующие цели: а) инактивировать микроорганизмы (они погибают); б) закрепить их на поверхности стекла и предотвратить их смывание при последующем окрашивании; в) повысить восприимчивость клеток к красителям.

Для более детального изучения структуры клеток используют **фиксирующие растворы**, предотвращающие ферментативный автолиз бактерий и стабилизирующие макромолекулы путем химического их сшивания. Наиболее часто применяют формалин, спирты, жидкость Карнуа, ацетон и др. Мазки фиксируют, помещая препараты в раствор фиксатора на некоторое время или нанося фиксатор на мазок.

Окрашивание препаратов. Способность клеток воспринимать различные красители отражает их **тинкториальные** свойства. Это определяется структурой и составом клеточной стенки.

В основе окраски лежат сложные химические и физико-химические реакции. Протоплазма бактерий, особенно в фиксированных мазках, обладает сродством к основным красителям. Окрашивание препаратов проводится с помощью красителей, которые можно разделить на:

- **позитивные** (метиленовый синий, фуксин и др.) и **негативные** (нигрозин, тушь). Позитивными называются красители, окрашивающие микроорганизмы, негативными – красители, заполняющие пространство, окружающее микроорганизмы, в результате чего последние становятся видимыми как силуэты на фоне красителя;

- **кислые** (эозин, кислый фуксин, конго красный) и **щелочные (основные)** (гематоксилин, азур, сафранин, основной фуксин). Кислые красители связываются с веществами, имеющими щелочную реакцию (например, цитоплазматическими белками), щелочные – связываются с кислыми компонентами клеток (нуклеиновыми кислотами, рибосомами). Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Основные цвета окрашивания могут быть следующими: красный (основной фуксин, кислый фуксин, сафранин, конго красный); фиолетовый (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый); синий (метиленовый синий, толудиновый синий, водный синий); зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

4 Простые и сложные методы окраски

Выделяют простые и сложные методы окраски.

Простыми методами окрашивания называют окрашивание препаратов каким-либо одним красителем. Некоторые микроорганизмы (спирохеты) плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко выявляются при окрашивании негативными красителями.

Техника приготовления препарата заключается в следующем. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки (мостик), которые лежат над кюветой. На мазок наносят с помощью капельницы 1 % водный раствор фуксина или метиленового синего на 1–2 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя не подсыхал. После завершения окрашивания, краситель сливают. Препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают. Для этого нижнюю сторону препарата промокают фильтровальной бумагой, а верхнюю сторону осторожно обсушивают с боков, не дотрагиваясь до мазка. Препарат окончательно досушивают на воздухе или высоко над пламенем спиртовки. Для получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. **Метод окрашивания в модификации**

Синева позволяет использовать вместо раствора красителя заранее пропитанную им фильтровальную бумагу. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки. Микроскопируют препараты с иммерсионной системой.

При **сложных (дифференцирующих) методах** окрашивания на один и тот же препарат воздействуют несколькими красящими веществами, одно из которых называется основным, другие – дополнительными. Кроме красителей используются различные обесцвечивающие вещества: спирты, кислоты, ацетон и др. С помощью сложных методов окрашивания выявляют цитологические особенности клеток микроорганизмов (клеточные структуры, включения и т. д.).

Окраска по методу Грама является самым универсальным из сложных методов окраски. Окраска положена в основу дифференциации бактерий и отражает способность клеток воспринимать и удерживать внутри клетки красящий комплекс генцианового фиолетового и йода либо терять его после обработки спиртом. Соответственно выделяют грамположительные (*Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Sarcina, etc.*) и грамотрицательные (*Escherichia, Pseudomonas, Erwinia, Neisseria, Rickettsia, etc.*) формы.

Для получения достоверных результатов необходимо готовить мазки для окраски по Граму из молодых, активно растущих (обычно односуточных) культур, так как клетки из старых культур иногда дают неустойчивую реакцию по Граму. Грамотрицательные бактерии могут выглядеть как грамположительные, если бактериальная пленка (мазок) слишком толста и обесцвечивание спиртом не проведено до конца. Грамположительные бактерии могут выглядеть как грамотрицательные, если мазок переобесцвечен спиртом.

Сущность метода. На поверхности цитоплазмы клетки у грамположительных микроорганизмов располагается комплекс из белка и рибонуклеата магния, отсутствующий у грамотрицательных бактерий. При окрашивании по Граму на поверхности грамположительных клеток образуется прочный комплекс из белка, рибонуклеата магния, генцианвиолета и йода, не разрушающийся при обработке спиртом. Такие бактерии остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают свойством удерживать краску и при обработке спиртом обесцвечиваются. Для выявления их препарат докрашивают

фуксином. При этом грамотрицательные бактерии окрашиваются в красный цвет.

Этапы дифференцированного окрашивания по Граму:

- Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги (1,5 x 1,5 см) и на него до полного смачивания наносят карболовый раствор генцианового фиолетового или кристаллический фиолетовый (чаще используют модификацию Синева). Окрашивание проводят на протяжении 1–2 мин.

- Бумажку снимают, краситель сливают и, не промывая препарат водой, наносят на препарат раствор Люголя на 1–2 мин до почернения мазка.

- Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96° этиловым спиртом. Для этого препарат 2–3 раза помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек (время обесцвечивания – не более 30 с), либо наливают 2–4 капли спирта на мазок на 30–45 с.

- Препарат быстро промывают водой (как описано выше).

- Мазок дополнительно окрашивают на протяжении 1–2 мин водным раствором фуксина (фуксин Пфейффера).

- Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой.

- микроскопируют с иммерсионной системой.

- **Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.**

Нуклеоид. Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи светового микроскопа трудно. Для избирательного окрашивания нуклеоида фиксированные клетки предварительно обрабатывают рибонуклеазой или разбавленной соляной кислотой, чтобы разрушить рибосомальную РНК. Последующее окрашивание основным красителем позволяет выявить нуклеоид в виде плотных тел с неправильными очертаниями, расположенные в центре или на полюсах клетки.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена отражает особенности микобактерий и нокардий.

Принцип метода. Кислотоустойчивость этих бактерий связана с высоким содержанием липидов в клеточной стенке. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются карболовым фуксином Циля при нагревании препарата в красный цвет и сохраняют эту

окраску после обесцвечивания серной кислотой. Некислотоустойчивые бактерии обесцвечиваются кислотой и в последующем докрашиваются метиленовым синим в синий цвет.

Для **выявления капсул** пользуются различными методами, среди которых можно отметить **метод Бурри** и **Бурри-Гинса**. В основе метода лежит негативное контрастирование. Так как капсула или тело микробной клетки не воспринимает красители, тушью окрашивается лишь фон микропрепарата. Капсула видна как неокрашенная зона на темном фоне тушевого мазка. По методу Бурри-Гинса тела микробных клеток дополнительно окрашиваются в красный цвет фуксином.

Для **окрашивания жгутиков** предложено несколько методов, общим этапом для которых является протравливание препарата (обычно растворами таннина, $KAl(SO_4)_2$, $HgCl_2$) и последующая окраска (чаще карболовым раствором фуксина). В результате этого на жгутиках происходит осаждение красителя, благодаря чему одновременно достигается как увеличение их толщины, так и уменьшение прозрачности. Одним из предложенных методов окрашивания жгутиков является **метод Лейфсона**. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой. **Клетки бактерий окрашиваются в красный цвет, жгутики принимают вид толстых нитей, отходящих от клетки.**

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите основные морфологические типы клеток микроорганизмов.
- 2 Охарактеризуйте схематичное строение бактериальной клетки.
- 3 Перечислите этапы приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов, охарактеризуйте их.
- 5 Классифицируйте используемые в микробиологии красители, охарактеризуйте их.

Практическое занятие 4

Цель: ознакомление с методикой приготовления фиксированных препаратов, простыми и сложными методами окраски; ознакомление с морфологией и цитологией различных микроорганизмов.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, предметные и покровные стекла, спиртовки, бактериальные петли, иммерсионное масло, стерильные пипетки, пинцеты, фильтровальная бумага, спички, палочки ватные гигиенические, маркеры, стерильные чашки Петри, на группу – в 50 мл колбе стерильная водопроводная вода, дистиллированная вода для промывки, промывалки, кюветы, мостики, набор готовых растворов красок в штативе, спирт 96⁰, пипетки, настои из естественных материалов: мяса, гороха и т.д.

Ход работы

1 Рассмотреть разнообразие форм прокариот на рисунке 4.2. Описать морфологию всех представленных форм согласно схеме таблицы 4.1. Оформить таблицу в тетради.

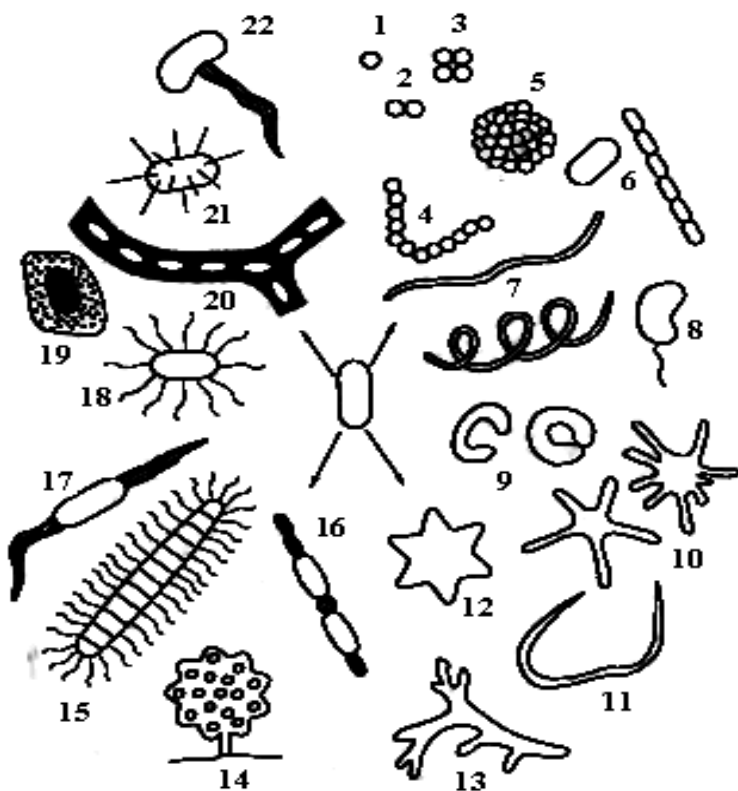


Рисунок 4.2 – Разнообразие форм прокариот

Таблица 4.1 – Морфология клеток микроорганизмов

№ п/п	Рисунок микроорганизма	Форма клетки, сочетание

2 Рассмотреть рисунок 4.1. Определить указанные под номерами структуры бактериальной клетки. Зарисовать схему в рабочей тетради, сделать соответствующие записи названий.

3 Ознакомиться с этапами и техникой приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.

4 Составить схему простого метода окрашивания.

5 Составить схему окрашивания препаратов по методу Грама.

6 Приготовить фиксированный препарат с использованием простых методов окраски.

7 Приготовить фиксированный препарат по методу Грама.

8 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х.

9 Охарактеризовать особенности морфологии клеток микроорганизмов согласно схеме таблицы 4.2, записать в рабочую тетрадь. Выполнить рисунки, под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 4.2 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Состав среды, объект исследования	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Окраска по Граму	
Рисунок клеток	
Выводы:	

10 Указать в выводах наблюдаемое разнообразие прокариот; преимущества использования в работе фиксированных препаратов.

Тема 5 Питательные среды: состав, назначение, техника приготовления

- 1 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу
- 2 Классификация питательных сред
- 3 Приготовление питательных сред
- 4 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике

1 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу

Потребности микроорганизмов в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма.

В широком смысле слова питательная среда должна соответствовать следующим требованиям:

Во-первых, питательная среда должна включать доступный для клетки *источник энергии*. Для одних организмов (фототрофов) таким источником служит свет, для других – органический (хемоорганотрофы) или неорганический (хемолитотрофы) субстрат.

Во-вторых, среда должна содержать все необходимые *компоненты для биосинтетических процессов* в клетке. Причем синтетические способности микроорганизмов могут варьировать от использования углекислого газа в качестве единственного источника углерода (автотрофы) до потребности в более восстановленных соединениях углерода – кислотах, спиртах, углеводах и др. (гетеротрофы).

В узком смысле слова любая искусственная питательная среда должна соответствовать следующим требованиям: содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме; иметь оптимальную влажность, вязкость, pH, быть изотоничной, сбалансированной с высокой буферной емкостью и, по возможности, прозрачной.

Питательной средой в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Еще в 1930 году их

было классифицировано не менее двух тысяч, но число ингредиентов, являющихся их неотъемлемыми компонентами, относительно невелико, а их композиции создаются на определенных общих принципах. Для размножения любых бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и биохимические питательные компоненты.

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Например, бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO_2 , органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *E.coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**.

2 Классификация питательных сред

Выбор питательной среды зависит в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их следующих особенностей.

1) По составу питательные среды делятся на **натуральные** и **синтетические**.

Натуральными называют среды, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения, имеющих **неопределенный химический состав**. Примерами питательных сред такого типа являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, мышц млекопитающих), образующихся при их гидролизе. Кислотный (HCl) гидролиз белков используется для приготовления полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина, панкреатина, папаина приводит к неполному гидролизу белков, в результате чего образуются **пептоны**. Как правило, на

пептонных питательных средах микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. При ферментативном гидролизе, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих небольшие пептиды, потому что их они могут усваивать непосредственно, а отсутствующие аминокислоты – нет.

К питательным средам неопределенного состава можно отнести и среды, полученные на основе растительного сырья: картофельный агар, томатный агар, отвары злаков, дрожжей, пивное сусло, настои сена и др. К числу сред неопределенного состава относят и среды **полусинтетические**. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; а также добавляют небольшое количество дрожжевого или кукурузного экстракта (или любого другого природного продукта) для обеспечения неизвестных потребностей роста. **Основное назначение** таких питательных сред – выделение, культивирование, получение биомассы и поддержание культур микроорганизмов.

Синтетические среды – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Обязательными компонентами таких сред являются неорганические соли и углерод- и азотсодержащие вещества (типичными представителями являются глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. **Основное назначение** таких питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетических рекомбинантов и т. д.

2) По назначению среды разделяют на **основные, элективные и дифференциально-диагностические**.

К **основным** относятся среды, применяемые для выращивания многих бактерий. Например, это триптические гидролизаты рыбных продуктов или казеина, из которых готовят жидкую среду (питательный бульон) и плотную (питательный агар). К ним относят и мясо-пептонный агар (МПА), который применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, и солодовый агар (СА) – применяют для культивирования дрожжей и плесневых грибов. Такие среды

служат основой для приготовления более сложных питательных сред. В качестве **основных** иногда используют синтетические питательные среды, к которым добавляют аминокислоты, витамины, пептон, дрожжевой экстракт и т.д.

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и т.д. Принцип построения таких сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды.

В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Например, среда Левина в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий, исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Данная среда позволяет отличать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*. Для этой же цели на практике часто используют среду Эндо.

3) По консистенции среды могут быть **жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими.**

3 Приготовление питательных сред

Жидкие питательные среды получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими.

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии со времен Р. Коха. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции.

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатина, силикагель, каррагенан.

Наиболее распространенным из уплотнителей является **агар** – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из двух полисахаридов – агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов многих видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) наиболее часто используемые концентрации 1,5–2,0 % являются относительно невысокими и их применение относительно экономично.

Желатина – белок, приготовленный из кожи и костей. «Уплотняющая» концентрация желатины – 17–20 %. Используется для специальных целей, поскольку образуемый ею гель плавится при температурах около 30 °С. Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов.

Силикагелем называют двуокись кремния (SiO_2). Среды на основе силикагеля (1,5–2,0 %) используют для получения культур автотофных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества. С помощью силикагелиевых сред также можно определять потребности бактерий в витаминах.

Каррагенан («растительная желатина») – добывается путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Каррагенан дешевле агара, используется в концентрации 2 %, не

разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре – 55–60 °С.

Полужидкие среды содержат гелеобразующее вещество в низкой (0,3–0,7 %) концентрации и имеют мягкую желеподобную консистенцию. Такие среды пригодны для изучения подвижности и хемотаксиса клеток, культивирования микроаэрофилов.

Сыпучие среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного сырья (чаще всего растительного). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или водки), сельском хозяйстве (силосование кормов, выращивании грибов) и т. д.

Определение состава питательной среды предполагает, что при этом будут учтены и такие биофизические факторы как рН среды, температура, подача и удаление молекулярного кислорода, являющимися критическими для роста любой бактериальной культуры.

4 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике

В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах – триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин) и питательный агар. Сухие среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и приготовлении, имеют относительно стандартный состав.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Определите понятие «питательные среды».
- 2 Какие требования предъявляют к составу питательных сред?
- 3 Поясните на примерах классификацию питательных сред.
- 4 Какие вещества используются для получения твердых сред?
- 5 Почему агар является наиболее используемым уплотнителем при приготовлении плотных сред?
- 6 Перечислите наиболее распространенные питательные среды в бактериологической практике, охарактеризуйте их.
- 7 Почему сухие питательные среды чаще всего используются в бактериологической практике?

Практическое занятие 5

Цель: ознакомление с наиболее часто употребляемыми питательными средами, их составом, назначением, техникой приготовления.

Оборудование и материалы: дистиллированная вода, электрическая плитка, мерные цилиндры, весы, шпатель, стерильные колбы на 250 мл с ватными пробками, хозяйственная рукавица, сухие питательные среды разного состава, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички, чашки Петри с питательной средой.

Ход работы

1 Изучить составы ниже приведенных питательных сред, записать в рабочую тетрадь название сред и их составы. Охарактеризовать каждую из них согласно классификации: по составу, назначению, консистенции; указать условия культивирования микроорганизмов на каждой из сред?

Среда 1, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, pH – 7,2.

Среда 2, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, цистеин – 0,01, агар – 15, pH – 7,2.

Среда 3. Среда М 9 (основа для культивирования почвенных бактерий), (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, pH – 7,2.

Среда 4, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, pH – 7,2.

Среда 5, (г/л): пептон – 5, мясной экстракт – 5, бромкрезоловый пурпурный 1,6% раствора – 0,625 мл, крезоловый красный 0,2% раствора – 2,5 мл, глюкоза – 0,5 г, пиридоксаль – 0,5, pH среды – 6,0.

Среда 6. Среда Эшби (концентрированная) для культивирования азотфиксирующих микроорганизмов, (г/л): KH_2PO_4 – 2, NaCl – 2, K_2SO_4 – 1, MgSO_4 – 2, CaCO_3 (мел) – 50, маннит – 200, pH – 7,2.

Среда 7. Мясопептонный бульон (для культивирования широкого круга микроорганизмов), (г/л): мясная вода, NaCl – 0,5 %.

Среда 8. Картофельная среда (в основном для культивирования спорообразующих бактерий), (г/л): картофель, мел – на кончике ножа.

Среда 9. Среда (для выделения актиномицетов), (г/л): крахмал растворимый – 20, KNO_3 – 1, K_2HPO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, NaCl – 0,5, FeSO_4 – следы, вода водопроводная, pH 7,2–7,3.

Среда 10. Для выделения культур *Clostridium*, (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, вода водопроводная, глюкоза – 20, пептон – 5, CaCO_3 – 10, pH – 7,0.

Среда 11. Для выделения микроорганизмов, растворяющих фосфаты кальция, (г/л): глюкоза – 10, аспарагин – 1, K_2SO_4 – 0,2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, дрожжевой экстракт – 0,02, агар – 15, вода водопроводная.

Среда 12. Выделение культур микобактерий, (г/л): NH_4Cl – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,2, CaCO_3 – 0,2, вода водопроводная.

Среда 13. Выделение культур лактобацилл, (г/л): гидролизат казеина – 10, мясной экстракт – 10, дрожжевой экстракт – 5, глюкоза – 20, ацетат натрия – 5, цитрат аммония – 2, K_2HPO_4 – 2, MgSO_4 – 0,2, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, вода дистиллированная.

Среда 14. среда Гиса, (г/л): пептон – 10, NaCl – 5, K_2HPO_4 – 10, индикатор Андрее – 1% или бромкрезоловый пурпурный – 1,6%, агар – 5, вода дистиллированная, pH – 7,2.

Среда 15, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, агар – 20, pH – 7,2.

2 Приготовить 150 мл плотной питательной среды.

Последовательность приготовления питательной среды с использованием сухого питательного агара следующая:

2.1 Налить в 250-мл стерильную колбу 150 мл дистиллированной воды.

2.2 Взвесить нужное количество питательной среды (5 г из расчета на 100 мл).

2.3 Засыпать сухой питательный агар в холодную воду.

2.4 Тщательно размешать. Закрыть колбу ватной пробкой, соблюдая приемы поддержания стерильности.

2.5 Поставить колбу со средой на электрическую плитку. Довести среду до полного растворения агара, не допуская его пригорания.

2.6 Простерилизовать среду.

2.7 Остудить среду до 45 °С.

2.8 С соблюдением приемов стерильности разлить среду по 25 мл в стерильные чашки Петри.

2.9 Дать застыть агаризованной среде.

Тема 6 Анализ микрофлоры воздуха

- 1 Микрофлора воздуха, ее изучение
- 2 Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха
- 3 Изучение культуральных особенностей микроорганизмов

1 Микрофлора воздуха, ее изучение

Воздух – среда, наименее благоприятная для жизни микроорганизмов. Микробные клетки и их споры попадают в воздух из почвы или воды вместе с пылью и аэрозолью (**аэрозоль** – коллоидная система, состоящая из воздуха, капелек жидкости или твёрдых частиц, и включающая различные микроорганизмы; размер аэрозольных частиц варьирует от 10 до 2000 нм). Хорошая освещенность воздуха солнечными лучами УФ-спектра, отсутствие питательных веществ и влаги – все эти условия не способствуют жизни микробов в воздухе. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли и фрагментов почвы.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микрофлоры. Бактериальная обсеменённость жилых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха; это справедливо и в отношении патогенных микроорганизмов, попадающих в воздух от больных людей, животных и бактерионосителей.

Микрофлору атмосферного воздуха условно разделяют на **резидентную** (постоянно обнаруживаемую) и **временную** (обнаруживают спорадически). Наибольшее количество микробов содержится в околосземных слоях атмосферы. По мере удаления от земной поверхности воздух становится чище.

Постоянная микрофлора атмосферного воздуха формируется почвенными микроорганизмами. Более или менее регулярно в её состав входят *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidam*, *Sarcina flava*, *S. alba*, *S. rosea*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, виды *Actinomyces*, грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Временная микрофлора атмосферного воздуха также формируется за счёт микроорганизмов почвы и видов, поступающих с поверхности водоёмов. Находящиеся в атмосферном воздухе микроорганизмы подвергаются солнечному и температурному

воздействию, атмосферным осадкам и ветру. Поэтому микрофлора воздуха весьма динамична, непрерывно меняется и обновляется.

Контаминация воздуха патогенными микроорганизмами происходит капельным путём; микробы содержатся в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чиханьи. Также микроорганизмы попадают в воздух со слущивающимся эпителием кожных покровов, пылью из загрязнённого постельного белья и заражённой почвы.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования, определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, гемолитических стрептококков, являющихся показателями контаминации микрофлорой носоглотки человека). Кроме того, при исследовании воздуха медицинских стационаров (родильные дома) основное внимание направлено на выявление патогенных стафилококков, синегнойных палочек, других условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций. На предприятиях микробиологической промышленности выявляют наличие и содержание микроорганизмов-продуцентов. Определение тех или иных патогенных или условно-патогенных микроорганизмов из воздуха проводят на специальных дифференциально-диагностических средах. Изучение состава микрофлоры воздуха имеет большое значение для санитарной оценки этой среды.

2 Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха

Количественный учет микрофлоры воздуха. Для исследования общего количества микроорганизмов в воздухе применяют наиболее простой, хотя и недостаточно точный, **метод «оседания» (седиментационный метод)**, предложенный Кохом (1881). Стерильные чашки Петри с питательной средой (МПА (мясо-пептонный агар) – для бактерий, СА (сусловый агар) – для грибов) открывают в исследуемом помещении на 5 минут (чашки располагают на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека). Следят за тем, чтобы при открывании крышки чашки Петри не было движения воздуха. После этого чашки закрывают и помещают на сутки в термостат при 37 °С, что дает возможность развиваться бактериальной флоре. Затем чашки переставляют в термостат и выдерживают при температуре 25 °С. В таких условиях прорастают бактерии, требующие для своего развития

более низкие температуры, а также плесневые грибы. Обычно опыт ставится в двух повторностях. Затем подсчитывают выросшие колонии микроорганизмов. Счет колоний на чашках производят с помощью прибора для счета колоний бактерий или лупы. Для лучшей видимости считают колонии на темном фоне (под чашку кладут темную бумагу), чашки помещают дном кверху. Каждую колонию отмечают на две чашки чернилами или тушью.

Седиментационный метод – самый простой метод для суждения о зараженности воздуха микроорганизмами, но он позволяет иметь лишь ориентированное представление о содержании микрофлоры в воздухе. С его помощью определяется только **35-60% микроорганизмов в воздухе**. Хотя этот метод и не дает полного представления ни о количестве микроорганизмов, находящихся в воздухе, ни об их видовом разнообразии, однако с его помощью можно учесть микрофлору тяжелой оседающей пыли, которая не захватывается и не учитывается другими аспирационными методами. Метод не точен и абсолютно не пригоден для изучения атмосферного воздуха, где имеют место большие колебания в скорости его движения. Этот метод может быть использован для анализа микрофлоры воздуха в закрытых помещениях в тех случаях, когда отсутствуют более совершенные приборы или нет электроэнергии.

Используя данный метод можно рассчитать количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Обычно производят перерасчет по Омелянскому: допускают, что на площадь в 100 см^2 за 5 мин осаждается примерно столько бактерий, сколько их содержится в 10 л воздуха ($0,01 \text{ м}^3$). Зная площадь чашки Петри, определяют количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Для этого: 1) определяют площадь агаровой пластинки в чашке Петри по формуле $S = \pi \times r^2 = 3,14 \times r^2$ (радиус чашки Петри равен $0,5 \text{ дм}$, соответственно, площадь агаровой пластинки равна $0,785 \text{ дм}^2$); 2) вычисляют количество колоний на площади 1 дм^2 ; 3) пересчитывают количество бактерий на 1 м^3 воздуха, умножая найденное количество колоний на площади 1 дм^2 на 100; 4) результаты определения микробного числа воздуха оценивают по суммарному числу колоний, выросших на обеих чашках; 5) обязательно учитывают, что полученные показатели занижены примерно в 3 раза.

После проведенного подсчета, при наличии в 1 м^3 воздуха менее 250 клеток воздух считается чистым, 250–500 клеток – загрязненным в средней степени, при количестве клеток более 500 – загрязненным. По данным А. Ф. Войткевича, в 1 м^3 морского воздуха содержится 1–

2 клетки, в таком же объеме воздуха в городском парке – 200, городской улице – 5 тыс., жилом помещении – 20 тыс., скотном дворе – более 1 млн. клеток.

Для исследования микрофлоры воздуха можно использовать различные аспирационные методы, например, аппарат Кротова, работа которого основана на принципе ударно-прибивного действия воздушной струи. Подобные методы наиболее надежны и точны.

При качественном анализе микрофлоры воздуха отмечают культуральные особенности роста микроорганизмов на плотных питательных средах, общее количество типов колоний, их морфологические особенности и количественное соотношение. Отдельные колонии микроскопируют с иммерсионной системой либо пересевают на дифференциально-диагностические питательные среды для выделения чистых культур микроорганизмов, видовой состав которых можно определить, используя специальные определители.

3 Изучение культуральных особенностей микроорганизмов

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Рост на плотных питательных средах. На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

форму колонии – округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и т.д. (рисунок 6.1);

размер (диаметр) колонии измеряют в мм. Если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

профили колонии – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д. (рисунок 6.2);

блеск и прозрачность – колония блестящая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

цвет колонии – бесцветная (грязно-белые колонии относятся к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, красная, черная и др. Отмечают выделение пигмента в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, выделение пигментов в среду;

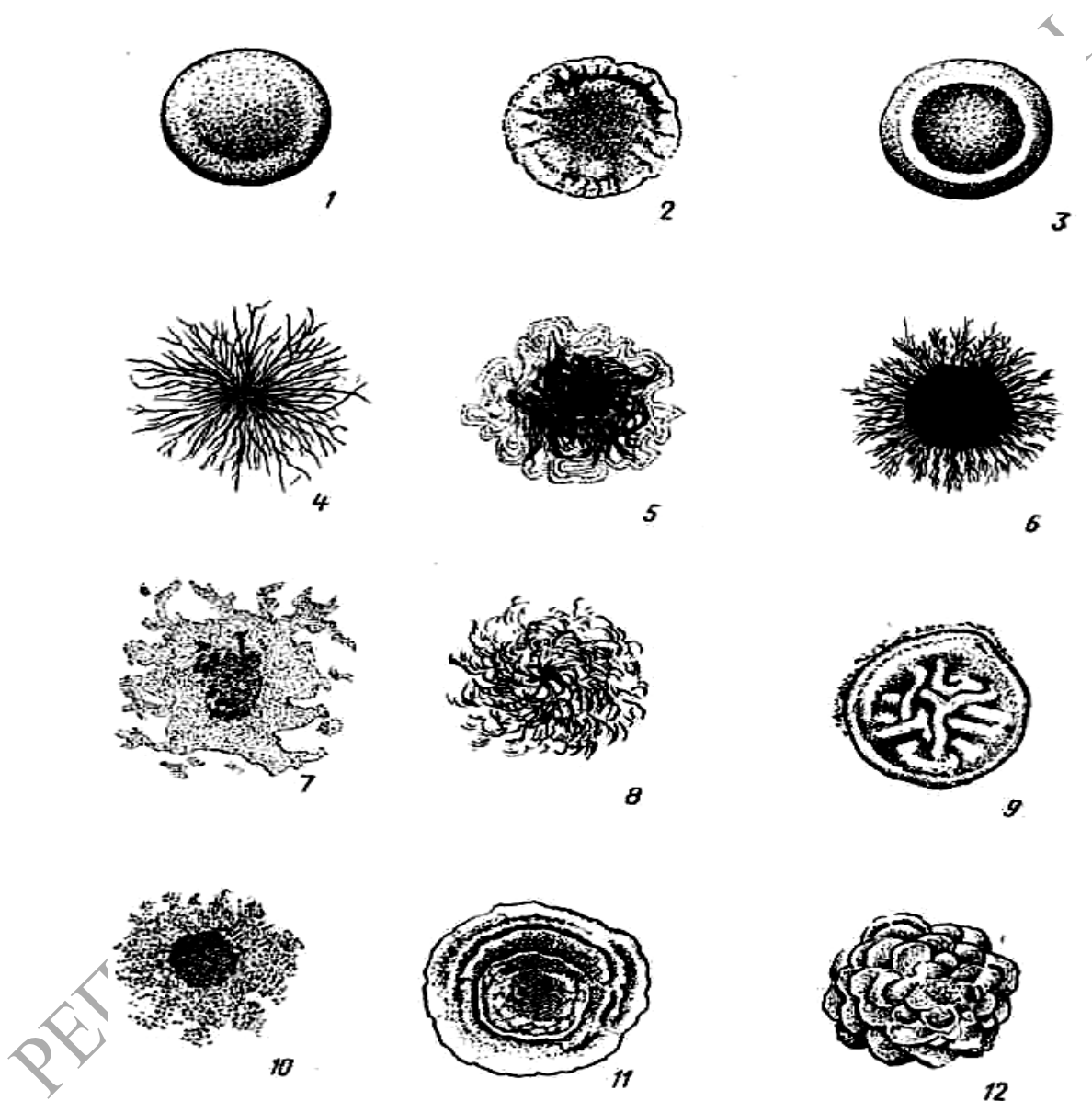


Рисунок 6. 1 – Форма колоний: 1 – круглая;
2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная;
8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная;
11 – концентрическая; 12 – сложная

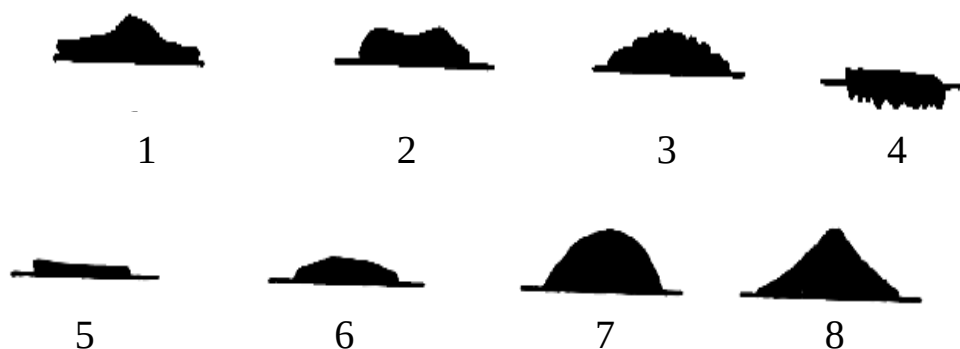


Рисунок 6.2 – Профиль колонии:

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый;
4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский;
6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

край колонии* – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д. (рисунок 6.3);

структура колонии* – однородная, мелко- и крупнозернистая, струйчатая и т.д. (рисунок 6.4);

*Край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку помещают на столик крышкой вверх.

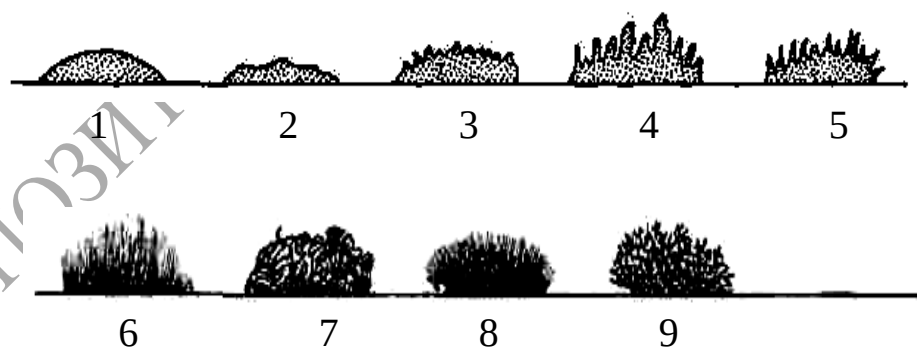


Рисунок 6.3 – Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый;
3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый;
7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

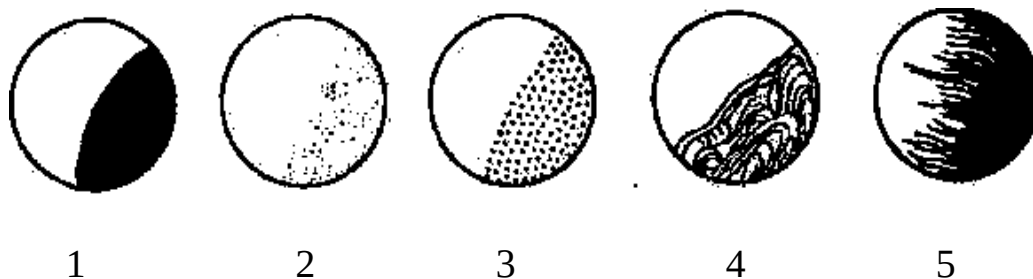


Рисунок 6.4 – Структура колонии: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, пленчатой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями наблюдается образование глубинных и донных колоний.

Глубинные колонии довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции имеющие форму овалов с заостренными концами. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если развивающиеся микроорганизмы выделяют углекислоту и другие газы.

Донные колонии образуются при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри. Эти колонии обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов либо вид тонких прозрачных пленок, стелящихся по дну.

Размеры и некоторые другие особенности колоний изменяются с возрастом и зависят от состава среды.

При описании **роста микроорганизмов по штриху** отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный (рисунок 6.5). Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию. При описании колонии и роста микроорганизмов по штриху обязательно указывают состав среды и возраст культуры, так как

колонии одного и того же организма на различных средах могут отличаться рядом признаков.

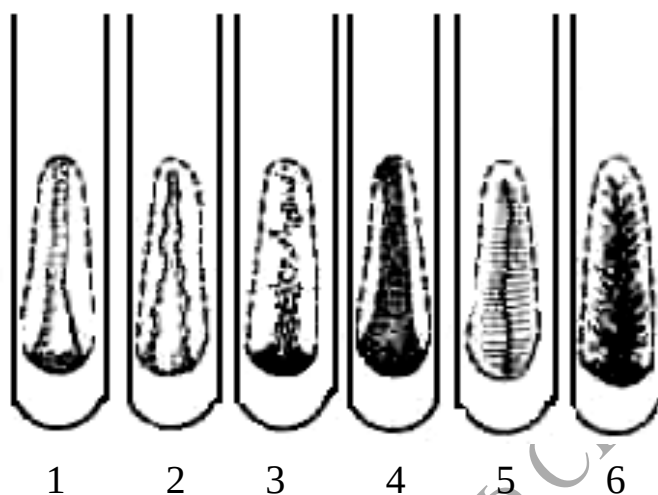


Рисунок 6.5 – Рост бактерий по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четко-видный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

В определителях обычно приведены описания колоний и роста микроорганизмов по штриху только на мясо-пептонном агаре или мясо-пептонной желатине.

Рост в жидких питательных средах. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах при стационарных условиях культивирования характеризуется большим единообразием по сравнению с ростом на плотных средах. Он сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост в жидкой среде, отмечают:

степень помутнения – слабая, умеренная или сильная;

особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая;

а при **образовании осадка** указывают – скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный;

нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа (последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков).

Для описания характера роста в жидких средах хемоорганогетеротрофные микроорганизмы выращивают на МПБ (мясопептонном бульоне) или на другой среде, обеспечивающей хороший рост этого организма. Чаще всего используют 4–7–суточные культуры.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Насколько точным является учет микрофлоры воздуха методом «оседания» на агаровые пластинки?
- 2 Какие факторы влияют на количество микроорганизмов в воздухе помещений?
- 3 Какие микроорганизмы обычно составляют микрофлору воздуха помещений?
- 4 Каково санитарное значение изучения состава микрофлоры воздуха помещений?

Практическое занятие 6

Цель: ознакомление с методами бактериологического исследования микроорганизмов; выполнение количественного и качественного учета микрофлоры воздуха помещений.

Оборудование и материалы: чашки Петри с агаризованной питательной средой, чашки Петри с культурами предыдущего занятия, стерильная водопроводная вода в пенициллиновой бутылочке – 3 мл, бактериологические петли, бактериологический шпатель, лупы, спиртовки, спички, стеклянные палочки, стерильные пипетки на 1 мл, маркер.

Ход работы

- 1 Не открывая чашку Петри, рассмотреть выросшие колонии. Выбрать одну колонию того морфологического типа, который преобладает в данном посеве.
- 2 С соблюдением стерильности, выполнить пересев бактериальной петлей клеток отобранной колонии на свежую среду в чашках Петри. Рассев бактерий произвести методом истощающего штриха.
- 3 Поместить пробирки с материалом в термостат при температуре 25 °С для инкубирования микроорганизмов.
- 4 Открыв чашку Петри, произвести визуальное обследование колоний микроорганизмов с использованием лупы.

5 Выполнить количественный учет микрофлоры воздуха в соответствии с описанными указаниями п. 2 настоящего руководства. Рассчитать количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Оценить степень загрязнения воздуха исследуемого помещения. Сделать соответствующие записи и расчеты в рабочей тетради.

6 Выполнить качественный учет микрофлоры воздуха по макроморфологическим свойствам согласно п. 3 настоящего руководства. Для рассмотрения признаков колоний использовать лупу.

7 Полученные данные записать в таблицу 6.1, сгруппировав колонии по морфологическим типам.

Таблица 6.1 – Признаки колоний микроорганизмов, выросших на питательной среде

№ колоний	Форма	Диаметр, мм	Блеск, прозрачность	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок колоний
1										
2										
3										
·										
·										
n										
Общее число всех регистрируемых колоний на чашке Петри										
Число разных типов колоний										
Количественное соотношение колоний разных типов										
Выводы:										

8 Отметить: 1) общее количество всех регистрируемых колоний на чашке Петри; количество разных типов колоний; рассчитать количественное соотношение колоний разных типов. Полученные данные записать в таблицу 6.1.

9 Сделать выводы: указать количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха исследуемого помещения, оценить степень его загрязнения; отметить разнообразие микрофлоры воздуха в анализируемом помещении.

Тема 7 Выделение чистых культур микроорганизмов

- 1 Понятие «чистые культуры микроорганизмов»
- 2 Методы получения накопительной культуры
- 3 Методы выделения чистой культуры
- 4 Способы определения чистоты выделенной культуры
- 5 Массовая культура на плотной среде

1 Понятие «чистые культуры микроорганизмов»

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются довольно редко. Тем не менее, основная часть современных представлений о свойствах бактерий, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому совершенно необходимой задачей является выделение чистых культур различных видов бактерий, существующих в естественных условиях. Для выделения чистых культур большинства бактерий обычно затрачивается не более 2–3 суток, однако для некоторых (например, бактерии туберкулеза), этот процесс может затягиваться до 4–6 недель. **Чистой культурой микроорганизмов** называют популяцию бактерий одного вида, представляющую потомство одной клетки. Выделение чистой культуры предполагает проведение трех этапов (рисунок 7.1): 1) получение накопительной культуры; 2) выделение чистой культуры; 3) определение чистоты выделенной культуры.

2 Методы получения накопительной культуры

В основе выделения и определения численности представителей отдельных групп микроорганизмов лежит получение накопительных культур с помощью создания элективных условий. **Накопительными** называют такие **культуры**, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов. **Элективными** называют **условия**, обеспечивающие преимущественное развитие определенной группы или вида микроорганизмов. При создании элективных условий учитывают особенности физиологии и метаболизма микроорганизмов: требования их к источникам питания, отношение к кислотности

среды, аэрации, температуре, способность к образованию эндоспор и т.д. Особенно часто селективные условия создают путем подбора соответствующей питательной среды.

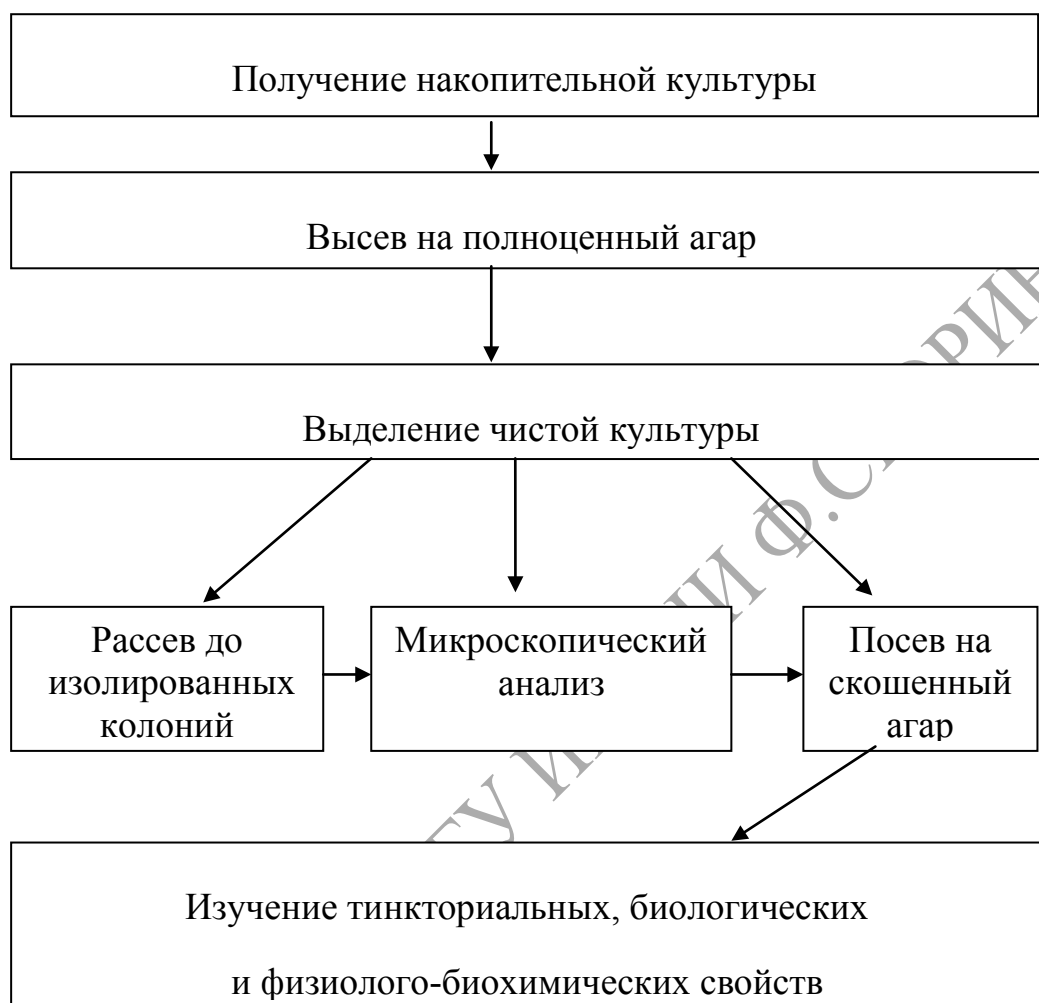


Рисунок 7.1 – Этапы выделения чистых культур микроорганизмов

Источником для получения бактериальных культур, родовую и видовую принадлежность которых необходимо определить, могут служить почва, воздух, вода, пищевые продукты, надземные и подземные части растений, а также различные тканевые жидкости животных и человека, отделяемое ран, слизистой оболочки и т.д.

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

К **физическим методам**, которые могут быть использованы при получении накопительной культуры, следует отнести регуляцию

роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение и др. Можно использовать также и особенности некоторых других физических свойств данного микроорганизма, например, его размеры, подвижность, что позволяет отделять данный микроорганизм от других членов популяции. В качестве примеров можно привести следующие:

- **Использование освещения для получения культур цианобактерий.** Такие виды легко выделяются из пресной воды и морских осадков. Для получения накопительных культур, образцы инкубируют при 25 °С и постоянном освещении от 500 до 3000 лк. Через 4–7 дней наблюдается увеличение мутности культуры, имеющей часто розовую, коричневую, желтую окраску.

- **Инкубация при низкой температуре для получения культур психрофильных бактерий.** Низкая температура способствует задержке роста многих бактерий. На первом этапе проводят инкубирование при температурах 0–5 °С в течение 14–24 дней.

При использовании химических методов применяют токсические вещества, которые убивают или подавляют рост оставшейся части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, эти вещества могут быть источниками питания, используемыми преимущественно отдельными бактериями в смешанной популяции.

Примерами использования химических методов для выделения микроорганизмов являются следующие:

- **Условия инкубирования в кислой среде для выделения культур лактобацилл.** Для выделения бактерий из сыров, высеив производится на среду, которая за счет ацетатной буферной системы имеет рН, равный 5,3. В этом случае *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* способны образовывать колонии, а другие молочнокислые бактерии – нет.

- **Ингибирование роста пенициллином для получения культур микоплазм.** Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они устойчивы к высоким концентрациям пенициллина, который подавляет рост многих бактерий с клеточной стенкой. Антибиотик, добавленный к питательной среде в концентрации 100–200 Е/мл, позволяет избавиться от посторонней чувствительной к нему микрофлоры.

- **Целлюлоза как субстрат для цитофаг.** Для получения накопительных культур цитофаг, разлагающих целлюлозу, на поверхность основного минерального агара помещают кусочки фильтровальной бумаги. На бумагу кладут частицы почвы или растительного материала и инкубируют чашки при комнатной температуре. Следят за образованием вокруг частиц желтой, оранжевой или розовой окраски, а также за процессом лизиса бумаги.

Биологические методы включают использование специфических хозяев выделяемого микроорганизма, а также преимуществ некоторых свойств патогенных микроорганизмов. К ним относятся такие методы как:

- **Получение накопительной культуры бактерий, патогенных для животных организмов.** Патогенные для животных бактерии можно выделить, заражая восприимчивое животное-хозяин смешанной культурой исследуемого материала, в котором предполагается его присутствие. В инфицированном животном патогенный микроорганизм часто преобладает и обнаруживается в крови и тканях в виде чистой культуры. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется и они гибнут. Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4–6 часов после внутрибрюшинного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *Streptococcus pneumoniae*. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшинной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

- **Симбиоз растений с *Rhizobium*.** Клубеньки, образуемые на корнях бобовых растений, представляют собой природную накопительную культуру симбиотических азотфиксирующих бактерий. Корни бобовых растений, содержащие клубеньки, промывают и отделяют часть корня с клубеньками. После поверхностной стерилизации корень помещают в воду, раздавливают пинцетом в одной чашке Петри, 1–2 петли такой суспензии переносят в следующую чашку и т. д. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный агар с маннитом. После застывания агара чашки инкубируют при оптимальной температуре.

Во многих случаях для получения накопительной культуры определенных бактерий используют сочетание физических, химических и биологических методов.

3 Методы выделения чистой культуры

Для выделения бактерий в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего это делают путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, используя метод посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры (**метод предельных разведений**). Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но и из их скоплений. Если микроорганизмы образуют слизь, то часто к ней прикрепляются посторонние формы. Для очистки предпочтительно использовать неселективную среду (МПА), поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить.

Получение изолированных колоний на твердой питательной среде достигается либо путем рассева взвеси микроорганизмов шпателем (**метод Коха**), либо с помощью бактериологической петли (**метод истощающего штриха**). В результате механического разобщения клеток микроорганизмов каждая из них может дать начало изолированной колонии одного вида микробов.

Рассев шпателем (метод Коха) производят в следующей последовательности:

- 1) на поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем;
- 2) шпатель достают, чашку быстро закрывают и переносят шпатель в чашку № 2, не стерилизуя его. Имитируют распределение культуры по всей поверхности среды, прикасаясь к ее поверхности той же стороной шпателя, которой ранее распределяли пробу;
- 3) точно те же действия проводят и в чашке № 3, после чего шпатель стерилизуют;
- 4) засеянные чашки помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре.

Через определенное время чашки достают из термостата и изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдают сплошной рост бактерий, в последующих чашках отмечают колонии.

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает высев бактериологической петлей из накопительной культуры на

поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рисунок 6.2, *А*). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рисунок 6.2, *Б*). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении *В* (рисунок 6.2), а после очередной стерилизации – в направлении *Г* (рисунок 6.2). Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах *А* и *Б* вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах *В* и *Г* формируются изолированные колонии.

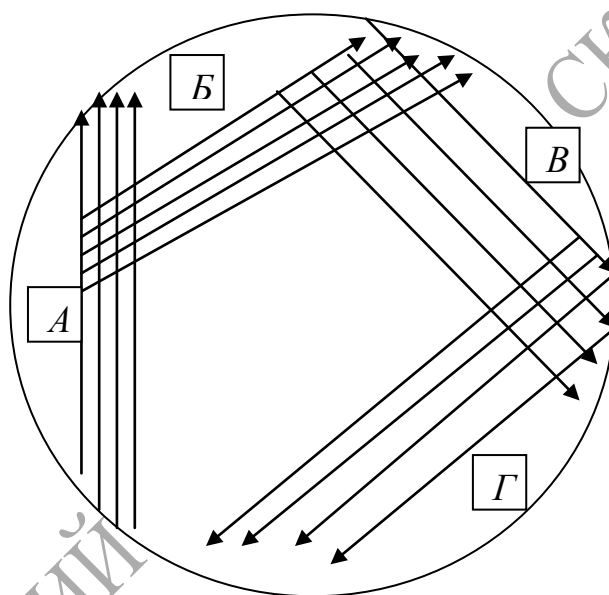


Рисунок 7.2 – Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Последовательные разведения в твердой среде – самый простой способ посева по чашкам, который заключается в том, что после инокуляции пробы в пробирку со стерильным расплавленным и охлажденным агаром, среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают ей застыть. Для получения хорошо изолированных колоний готовят ряд последовательных десятикратных разведений и по 1 мл проб вносят сразу в чашку, добавляют 15–20 мл расплавленной агаризованной среды и смешивают, покачивая чашку. Иногда отдельные колонии оказываются погруженными в агар и извлечь их

можно только механически. Плохо и то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара.

4 Способы определения чистоты выделенной культуры

Выросшие изолированные колонии отсевают бактериологической петлей на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирке. Поскольку изолированные колонии иногда могут формироваться не только из отдельных клеток, обязательным этапом выделения чистой культуры должна быть проверка их однородности. Это осуществляется несколькими способами: визуальным, микроскопическим, высевам на соответствующие питательные среды.

При визуальном контроле исследуют рост культуры по штриху на поверхности скошенной среды; в том случае, если рост неоднороден, считают, что культура загрязнена и требуется ее дополнительная расчистка. При описании колоний бактерий определяют их диаметр в миллиметрах, пигментацию, форму, высоту, профиль, вид края, поверхность колоний, отмечают степень прозрачности колоний и их консистенцию. На характеристики колоний могут влиять среда, возраст культуры, условия культивирования.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать путем **микроскопии клеток**. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток, который микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки чистых культур микроорганизмов, как правило, однородны по размеру и окраске по Граму. Однако следует помнить, что колонии, вырастающие из чистой культуры могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах многих бактерий могут появляться кокковидные клетки, цисты, споры. Наконец, многие микроорганизмы проявляют грамвариабельность.

Чистоту культуры клеток проверяют также и путем повторного **рассева на селективные среды**, обеспечивающие избирательный рост тех или иных микроорганизмов. Критерием чистоты в этом случае является однородность формирующихся при этом колоний.

5 Массовая культура на плотной среде

Выращиванием колоний на плотной среде получают

максимальную плотность клеток, поскольку в данном случае жидкость находится только в межклеточном пространстве. Если инокулят сильно разбавлен, каждая клетка в результате деления дает начало отдельной колонии. Это может быть полезным для массовой культуры, если отбор колонии ведут по одному признаку. Чаще инокулят бывает не разбавлен и его равномерно распределяют по всей поверхности среды. В этом случае микроорганизмы растут в виде сплошного газона.

Массовая культура бактерий на плотной среде имеет ряд преимуществ по сравнению с культурой, выращиваемой в жидкой среде:

1 В случае культур, выращенных на плотной среде, нет необходимости использовать центрифугу или другие средства для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии. Особенно следует избегать центрифугирования при получении большого количества патогенных или других вредных микроорганизмов, поскольку при этом образуются аэрозоли.

2 Массовые культуры бактерий на плотной среде относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Такие культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов, поскольку для их растворения необходимы значительно большие объемы среды. Следовательно, культуры, выращенные на твердой среде, особенно полезны для приготовления антигенов или для других целей, когда важна чистота клеточной суспензии.

3 На твердых средах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем. Например, плодовые тела миксобактерий и эндоспоры определенных видов *Bacillus* образуются только при росте культур на твердой среде.

Вместе с тем, выращивание микроорганизмов на твердых средах по сравнению с культивированием в жидкой среде имеет **определенные недостатки:**

1 Твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы. Она дает возможность легко получать граммы клеток; десятки граммов выращивать уже затруднительно, а сотни граммов или килограммы клеток на твердой среде в лаборатории вырастить невозможно.

2 Твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток, т. е. культура гетерогенна в физиологическом отношении. Например, клетки в верхней части твердой аэробной среды (слой глубиной до 1000 клеток) могут находиться в условиях низкого содержания питательных веществ, но высокого содержания кислорода, в то время как в нижних слоях среды условия могут быть противоположными. Гетерогенна культура и в техническом смысле, так как клетки микроорганизмов и питательная среда распределены неравномерно.

3 Твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Перечислите этапы выделения чистых культур микроорганизмов.
- 2 Охарактеризуйте различные методы получения накопительных культур микроорганизмов, укажите примеры.
- 3 Охарактеризуйте методы выделения чистой культуры.
- 4 Охарактеризуйте этап определения чистоты выделенной культуры, и применяемые на этом этапе методы.
- 5 Перечислите преимущества и недостатки массовой культуры бактерий на плотной среде.

Практическое занятие 7

Цель: ознакомление с этапами выделения чистой культуры; определение чистоты выделенной исследуемой культуры: визуально, микроскопически и по однородности колоний.

Материалы и оборудование: лупа, микроскопы биологические, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, бактериальные петли, иммерсионное масло, стерильные пипетки, пинцеты, фильтровальная бумага, спички, стерильная водопроводная вода, палочки ватные гигиенические, маркеры, дистиллированная вода для промывки, промывалки, кюветы, мостики, набор готовых растворов красок в штативе, спирт 96⁰, культуры микрофлоры воздуха с предыдущего занятия.

Ход работы

1 Ознакомиться с этапами выделения чистой культуры.

2 Зарисовать в рабочей тетради схему «Этапы выделения чистых культур микроорганизмов».

3 Просмотреть выделенную на предыдущем занятии культуру микроорганизмов.

4 Определить характер роста полученной культуры по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды в соответствии с указаниями п. 3 лабораторной работы 6. При выполнении визуального обследования микроорганизмов использовать лупу.

5 Полученные наблюдения описать согласно схеме таблицы 7.1, зарисовать рост микроорганизмов по штриху.

Сделать выводы об однородности колоний микроорганизмов и, соответственно, чистоте исследуемой культуры.

Таблица 7.1 – Описание роста микроорганизмов по штриху

Свойства	Особенности роста микроорганизмов
Состав среды	
Возраст культуры	
Рост микроорганизмов по штриху	
Блеск	
Прозрачность	
Цвет	
Поверхность	
Консистенция	
Рисунок	
Выводы:	

5 Приготовить препараты «раздавленная капля» и фиксированный (простая окраска, по Граму, на наличие спор).

6 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Отметить форму и сочетание клеток, подвижность, наличие или отсутствие спор. Сделать зарисовки.

7 Наблюдения и рисунки отметить в таблице 7.2. Под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 7.2 – Особенности морфологии клеток микроорганизмов

Свойства	Особенности морфологии клеток микроорганизмов
Состав среды	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Подвижность	
Окраска по Граму	
Наличие спор	
Рисунок клеток	
Выводы:	

8 Сделать выводы о чистоте исследуемой культуры на основании микроскопирования материала.

Тема 8 Способы генетического обмена у бактерий

- 1 Способы обмена генетической информацией
- 2 Трансформация
- 3 Конъюгация
- 3 Трансдукция

1 Способы обмена генетической информацией

Существуют три основных способа обмена генетической информацией, или горизонтального переноса генов: трансформация, трансдукция и конъюгация. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК. Могут происходить как естественным путем, так и при искусственных манипуляциях.

Общими особенностями для всех способов обмена генетической информацией у бактерий являются:

1 Процесс переноса ДНК всегда односторонний, или однонаправленный: от донорных бактерий к реципиентным.

2 Полного обмена генетической информацией не наблюдается, результатом чего является образование мерозиготы.

Состояние мерозиготы носит относительно непродолжительный характер, в конечном итоге экзогенота должна встроиться в эндогеноту. Если этого не происходит, то экзогенота элиминируется эндонуклеазами клетки-реципиента.

3 Для образования рекомбинантного потомства процесс генетического переноса должен обязательно закончиться рекомбинацией. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате чего возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называются *рекомбинантами*.

2 Трансформация

Трансформация – перенос генетической информации, при котором ДНК, выделенная из клетки-донора, поступает в клетку-реципиент. *Явление трансформации было открыто* Ф. Гриффитом в 1928 г. в опытах на пневмококках (*Streptococcus pneumoniae*).

Искусственным путем трансформацию хромосомной ДНК удалось осуществить не только между бактериями одного и того же вида, но и

между бактериями, принадлежащими к разным видам. Трансформировать клетки можно также и плазмидной ДНК.

Процесс трансформации, начиная с момента добавления ДНК из клеток донорного штамма к культуре реципиента, в общих чертах **включает следующие этапы, или стадии:**

1 Адсорбцию донорной ДНК на поверхности реципиентной клетки. На этом этапе ДНК чувствителен к ДНКазе.

2 Поглощение донорной ДНК реципиентной клеткой. Причем ДНК может поглощаться только теми клетками, которые находятся в состоянии компетентности. На этой стадии ДНК уже нечувствительна к действию ДНКазы.

3 Образование в реципиентной клетке одонитевых фрагментов донорной ДНК.

4 Синапсис одноцепочечной донорной ДНК с двухцепочечной хромосомой реципиента.

5 Интеграцию части донорной молекулы ДНК в реципиентную ДНК в результате рекомбинации.

6 Репликацию рекомбинантной молекулы ДНК.

7 Экспрессию генов, переданных от донора, т. е. образование рекомбинантов, называемых **трансформантами**. Количество переносимой при трансформации ДНК составляет около 10 т. п. н. (тысяч пар нуклеотидов).

Компетентностью при генетической трансформации обычно называется способность бактериальных клеток адсорбировать и поглощать чужеродную ДНК. Однако в последние годы в это понятие включают и все последующие стадии, вплоть до рекомбинации трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной бактерии.

У многих видов бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. У некоторых бактерий клетки компетентны в любой фазе роста (например, у гонококков и менингококков). К трансформации могут быть способны от 0,1 до 100% клеток популяции, в зависимости от вида бактерий.

Компетентные клетки у различных видов бактерий отличаются от некомпетентных не только способностью к поглощению ДНК, но и другими свойствами:

- обладают сниженным уровнем метаболизма;
- более устойчивы к пенициллину, чем остальные клетки в популяции;
- сниженным темпом репликации ДНК или вообще ее отсутствием;
- меньшими размерами, чем некомпетентные;

- изменением наружных слоев, наличием обнаженных участков цитоплазматической мембраны;
- повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке;
- сниженным поверхностным зарядом.

Однако существует много видов бактерий, у которых отсутствует естественная компетентность. Примером таких бактерий являются *E. coli* и другие, но, несмотря на это, они также могут быть трансформированы. Для этого их клетки обрабатывают тем или иным способом, индуцируя у них способность к поглощению ДНК.

Трансформация имеет практическое использование:

- для картирования бактериальной хромосомы;
- для конструирования промышленно-полезных штаммов микроорганизмов;
- для введения в геном бактерий определенных маркеров или элиминирования нежелательных мутаций;
- как один из этапов получения трансгенных растений;
- может выступать в качестве модели в различных генетических и молекулярно-биологических экспериментах на изолированной ДНК.

3 Конъюгация

Конъюгация – генетический обмен, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при их непосредственном контакте.

Явление конъюгации было открыто Дж. Ледербергом и Э. Татумом в 1946 г. в экспериментах с полиауксотрофными штаммами бактерий *E. coli*. Позднее У. Хейс показал, что существуют бактерии мужского (доноры) и женского (реципиенты) типа и вклад их в конъюгацию не равнозначен. Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только отдельные фрагменты генома.

Общая схема механизма передачи генетического материала при конъюгации. Перенос генетического материала от донора к реципиенту происходит только в том случае, когда образуются эффективные конъюгационные пары. Взаимное узнавание при контакте донорных и реципиентных клеток обеспечивают половые пили. Они прикрепляются к специфическим рецепторам, находящимся на поверхности реципиентных клеток. Благодаря

способности половых пилей сокращаться, клетки донора и реципиента вступают в контакт «клеточная стенка к клеточной стенке», а затем между клетками возникает более сложное образование – конъюгационный мостик, по которому ДНК переходит из клетки-донора в клетку реципиента.

При конъюгации перенос генетического материала обеспечивается конъюгативными плазмидами, такими, например, как F-плазида у бактерий *E. coli*. Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-опероны, ответственные за перенос генетического материала. Ряд генов *tra*-оперонов определяет синтез половых пилей, другие отвечают за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. Передача плазмиды или хромосомы начинается с одностороннего разрыва в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того чтобы произошла передача хромосомных генов, плазида F (или другая конъюгативная плазида) должна интегрироваться в хромосому. Разорванная в области *oriT* нить ДНК разматывается, и односторонняя ДНК, начиная с 5'-конца, переносится по конъюгационному мостику в реципиентную клетку. Одновременно на обеих нитях плазмидной и хромосомной ДНК – и той, которая остается в донорной клетке, и той, которая поступила в клетку-реципиент, синтезируются комплементарные им нити. Благодаря этому в клетке-доноре восстанавливается целостность хромосомы и F-плазмиды.

Заключительной стадией передачи F-плазмиды является восстановление ее исходной кольцевой структуры в клетке-реципиенте, а передачи хромосомной ДНК – рекомбинация ее с хромосомой реципиента.

Процесс переноса хромосомных генов при конъюгации может осуществляться также при участии содержащихся в хромосоме конъюгативных транспозонов. Такие транспозоны, кроме генов, отвечающих за транспозицию, и генов, детерминирующих фенотипические признаки, несут *tra*-гены, напоминающие соответствующие гены конъюгативных плазмид. Конъюгативные транспозоны могут выщепляться из хромосомы, образовывать плазмидоподобные структуры и, как и конъюгативные плазмиды, индуцировать перенос мелких плазмид в клетку партнера, а также сами переходить в нее.

Процессы конъюгации, особенно ведущие к передаче плазмид, очень широко распространены среди бактерий. Конъюгация – наиболее эффективный механизм для горизонтального переноса генов

в любой среде обитания бактерий. Конъюгировать могут бактерии, весьма далекие в систематическом отношении. Плазмиды, осуществляющие конъюгацию между неродственными бактериями и успешно поддерживающиеся в них, называются плазмидами широкого круга хозяев. Конечно, интеграция переданной хромосомной ДНК в геном реципиента за счет гомологичной рекомбинации при межродовых скрещиваниях практически всегда исключается; однако у бактерий имеются «обходные пути», функционирующие за счет незаконной (или негомологичной) рекомбинации.

Количество переносимой ДНК при конъюгации больше, чем при трансформации и трансдукции. В «мягких» (оптимальных для роста) условиях скрещивания может переноситься вся хромосома. Получаемые при этом способе обмена генетической информацией рекомбинанты называются **трансконъюгантами**.

Таким образом, **в процессе конъюгации можно различить следующие стадии:**

- образование неэффективных пар;
- образование эффективных конъюгационных пар;
- перенос генетического материала из донорных клеток в реципиентные;
- постконъюгационный синтез донорной ДНК в реципиентной клетке;
- гомологичная рекомбинация перенесенного фрагмента донорной ДНК с ДНК реципиентной клетки.

Как способ генетического обмена конъюгация используется в следующих направлениях:

- 1 Передача генетических маркеров из одних клеток в другие.
- 2 Метод конъюгационного скрещивания удобен для картирования хромосомы. Карта хромосомы у бактерий строится в минутах. У бактерий *E. coli* началом карты (0 мин) являются точки локализации генов, ответственных за синтез треонина и лейцина.
- 3 Изучение генетического аппарата у бактерий.
- 4 Конъюгация эффективно происходит в природе и поэтому является важной составляющей изменчивости бактерий.

4 Трансдукция

Трансдукция была открыта Дж. Ледербергом и Н.Циндером в 1952 г. у *Salmonella typhimurium* и фага P22.

Трансдукция – перенос генетической информации (хромосомных генов или плазмид) от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при участии бактериофагов. При трансдукции фрагменты хромосомы или плазмиды должны упаковаться в головку бактериофага; выйти в составе этой фаговой частицы из клетки-донора в результате ее лизиса и попасть в другую клетку (клетку-реципиент) при новом акте заражения. Белковый капсид фаговой головки предохраняет находящуюся в ней ДНК от разрушения внеклеточными нуклеазами. В этом отношении трансдуцирующая ДНК более «сохранна», чем «голая» ДНК при трансформации. Поскольку адсорбция хвостового отростка фага на рецепторах поверхности клетки видоспецифична, то и перенос генетического материала при трансдукции может происходить, в основном, между близкородственными бактериями.

При трансдукции размеры переносимого фрагмента ДНК определяются размерами головки бактериофага. Различные фаги могут переносить фрагменты ДНК от 20 до 40 т. п. н. Таким образом, при трансдукции передаются как единичные гены, как и сцепленные маркеры. Рекомбинанты, получаемые при данном способе обмена генетической информацией, называются **трансдуктантами**.

Изучение трансдукции показало, что одни фаги могут переносить разные бактериальные гены, а другие – только определенные. В соответствии с этим принято выделять два типа трансдукции: **1) генерализованная (неспецифическая, или общая); 2) специфическая, или ограниченная.**

При **генерализованной трансдукции** может переноситься любой бактериальный признак с частотой 10^{-5} – 10^{-6} . Количество бактериальной ДНК, которое может переноситься фагом, обычно составляет 1–2 % всей ДНК, содержащейся в клетке. Исключение составляет бактериофаг PBS1 *B. subtilis*, который может трансдуцировать до 8 % генома хозяина. В осуществлении генерализованной трансдукции бактериальный вирус является только «пассивным» переносчиком генетического материала бактерий. Трансдуцирующие дефектные фаги содержат только фрагменты бактериальной ДНК. А генетическая рекомбинация у трансдуцируемых бактерий происходит по общим закономерностям рекомбинационного процесса.

Характерными особенностями **специфической трансдукции** являются: 1) каждый трансдуцирующий фаг передает только строго определенную, весьма ограниченную область бактериальной

хромосомы; 2) фаг не только переносит генетический материал, но и обеспечивает его включение в бактериальную хромосому; 3) вирус включает ДНК бактерий в свой геном и передает ее, лизогенизируя бактерии-реципиенты.

Наиболее известным примером специфической трансдукции является трансдукция, осуществляемая фагом λ , который способен заражать клетки бактерий *E. coli* с последующей интеграцией его ДНК в геном бактерий.

Трансдукция имеет практическое использование:

- позволяет трансдуцировать плазмиды и короткие фрагменты хромосомы донора;
- для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Изогенные штаммы, сконструированные при помощи генерализованной трансдукции, различаются только по участку хромосомы, переносимому трансдуцирующим фагом;
- для точного картирования бактериальных генов, установления порядка и их расположения в оперонах.

Вопросы для самоконтроля

1 Какие процессы могут происходить в клетке-реципиенте, после попадания вовнутрь нее донорной ДНК и перехода в состояние мерозиготы?

2 Что такое процесс трансформации? Какие стадии он включает?

3 Перечислите основные стадии процесса конъюгации.

4 Охарактеризуйте процесс трансдукции. Чем отличается специфическая трансдукция от генерализованной?

Практическое занятие 8

Цель: изучение основных способов генетического обмена у бактерий; выявление общих и отличительных особенностей процессов трансформации, конъюгации и трансдукции.

Материалы и оборудование: демонстрационные схемы (рисунки): а) мерозиготы; б) процесса трансформации; в) механизма бактериальной конъюгации; г) F-плазмиды бактерий *E. coli*; д) генерализованной трансдукции; ж) специфической трансдукции;

электронная микрофотография конъюгирующих клеток *E. coli*; цветные карандаши.

Ход работы

В протоколе занятия:

1 Дать общую характеристику способам обмена генетической информацией у бактерий: указать три основных способа обмена генетической информацией, их общие особенности.

2 Нарисовать схему мерозиготы и показать два пути ее развития.

3 Охарактеризовать процесс трансформации согласно схеме описания: понятие трансформации, история открытия, этапы процесса трансформации, компетентность, практическое использование трансформации.

4 Составить графологическую схему «Стадии процесса трансформации», отразив в этой схеме по отдельности процесс трансформации: а) плазмидной ДНК; б) бактериальной ДНК.

5 Охарактеризовать процесс конъюгации согласно схеме описания: понятие конъюгации, история открытия, этапы процесса конъюгации, количество переносимой ДНК при конъюгации, практическое использование конъюгации.

6 Составить графологическую схему «Передача генетического материала при конъюгации», отразив в этой схеме по отдельности участие в качестве клеток-доноров: а) F^+ -доноров; б) доноров Hfr-типа.

7 Охарактеризовать процесс трансдукции согласно схеме описания: понятие трансдукции, история открытия, этапы процесса трансдукции, количество переносимой ДНК при трансдукции, типы трансдукции, практическое использование трансдукции.

8 Составить графологические схемы «Генерализованная трансдукция», «Специфическая трансдукция». Обратит внимание на существенные отличия между этими двумя типами трансдукции.

Тема 9 Молочнокислые бактерии

- 1 Общая характеристика молочнокислых бактерий и их особенности, типы брожения
- 2 Гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии
- 3 Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий
- 4 Качественные реакции на молочную кислоту

1 Общая характеристика молочнокислых бактерий и их особенности, типы брожения

Молочнокислые бактерии относятся к семействам *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*. Распространение в природе молочнокислых бактерий определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способом получения энергии. Они почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

- в молоке, молочных продуктах, в местах переработки молока (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и другие лактобациллы; *Streptococcus lactis*);
- на поверхности растений как эпифитная микрофлора и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*);
- в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микрофлоры (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* (зеленящий стрептококк) и др.).

В связи с тем, что молочнокислые бактерии используются для приготовления пищевых продуктов и выступают как возбудители болезней человека и животных, они представляют собой группу большого экономического значения.

Морфология клеток. Это морфологически гетерогенная группа бактерий, она включает палочковидные и сферические организмы, длиной от 0,7–1,1 до 3,0–8,0 мкм, расположенных единично или собранных в цепочки. Все молочнокислые бактерии грамположительны, не образуют эндоспор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*), капсул, и в подавляющем большинстве

неподвижны. Форма и длина клеток у различных культур одних и тех же видов молочнокислых бактерий часто зависит от состава среды, присутствия кислорода и способа культивирования.

Физиолого-биохимические свойства. Это факультативные анаэробы, использующие в качестве источника энергии углеводы и образующие в качестве основного продукта брожения молочную кислоту (по этому признаку их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов). У всех молочнокислых бактерий **обнаруживаются сложные потребности в факторах роста:** витаминах группы В, аминокислотах, пуринах и пиримидинах. Отличительная **физиологическая особенность молочнокислых бактерий** – их высокая устойчивость к молочной кислоте, что является следствием характерного для них энергетического метаболизма. Способность молочнокислых бактерий образовывать и переносить довольно высокие концентрации молочной кислоты имеет важное селективное значение, так как такое свойство дает им возможность успешно конкурировать с большинством других бактерий в средах, богатых питательными веществами.

Молочнокислые бактерии обычно способны только к брожению.

Молочнокислым брожением называют анаэробное разложение углеводов молочнокислыми бактериями с образованием молочной кислоты и других продуктов. В зависимости от того, какие молочнокислые бактерии вызывают это брожение и какие при этом образуются продукты, оно бывает двух типов – **типичное**, или **гомоферментативное**, и **нетипичное**, или **гетероферментативное**.

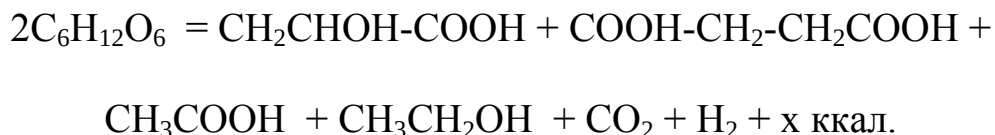
Химизм гомоферментативного молочнокислого брожения прост. Он заключается в гладком расщеплении гексозы на две молекулы молочной кислоты, без образования газообразных продуктов, по следующему суммарному уравнению:



Промежуточными продуктами при этом брожении являются пировиноградная кислота и водород. Присоединяя водород, пировиноградная кислота образует молочную кислоту.

Химизм нетипичного молочнокислого брожения более сложный, так как здесь при сбраживании углеводов, наряду с молочной кислотой, гетероферментативные бактерии образуют ряд других соединений: уксусную и янтарную кислоты, этиловый спирт, углекислоту и водород. Усложнение процесса брожения связано с

тем, что эти бактерии содержат в своих клетках фермент карбоксилазу, а у гомоферментативных бактерий он отсутствует. Общий химизм этого процесса может быть представлен схематическим уравнением так:



Молочнокислые бактерии можно разделить на две физиолого-биохимические подгруппы, различающиеся по продуктам, которые образуются из глюкозы в результате брожения (эта классификация была предложена в 1925 г. А.И.Клюйвером, Г.Л.Донкером): гомоферментативные и гетероферментативные.

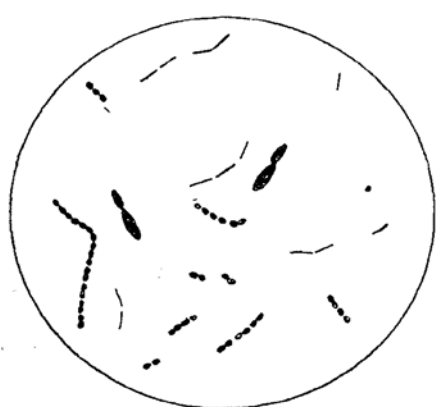
2 Гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии

К числу наиболее часто встречающихся типичных **гомоферментативных молочнокислых бактерий** относится молочный стрептококк (*Streptococcus lactis*). В молодых культурах он представляет собой типичный стрептококк, образующий цепочки различной длины из овальных клеток диаметром 0,5– 1,0 мкм (рисунок 9.1 – А). В старых культурах после свертывания молока преобладают сочетания в виде диплококков. Встречается он и в виде коротких бесспорных палочек, окрашивающихся положительно по Граму. Колонии молочного стрептококка на поверхности твердой питательной среды мелкие, выпуклые, слегка беловатые, напоминающие капли воды или жира. У *Streptococcus cremoris* (рисунок 9.2 – Б) клетки расположены более длинными цепочками.

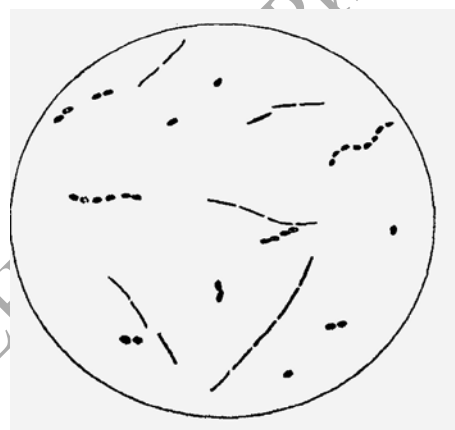
Lactobacillus bulgaricus (рисунок 9.1 –А) – крупная палочка длиной 4–5 мкм, неподвижная, грамположительная, располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек, оптимальная температура ее развития 40–45 °С. *Lactobacillus acidophilus* (рисунок 9.1 – Б) – по морфологии близка к болгарской, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С; используется для приготовления ацидофилина.

Также весьма важным представителем палочковидных форм типичных молочнокислых бактерий является болгарская палочка *Lactobacterium bulgaricum* (рисунок 9.1 – А). Это бесспорная,

неподвижная длинная палочка, иногда соединяющаяся парами или в короткие цепочки. На твердой питательной среде дает характерные колонии, напоминающие пучки ваты. Болгарская палочка широко распространена в природе и является типичным возбудителем естественного скисания молока. Чистая культура этой бактерии применяется при приготовлении мечниковской простокваши (лактобациллина). Близкая к ней по морфологическим признакам, но развивающаяся при повышенных температурах (около 40 °С) ацидофильная палочка (*Lactobacterium acidophilum*) используется при изготовлении ацидофильной простокваши (ацидофилина).

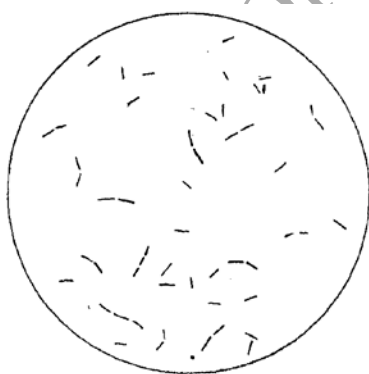


А

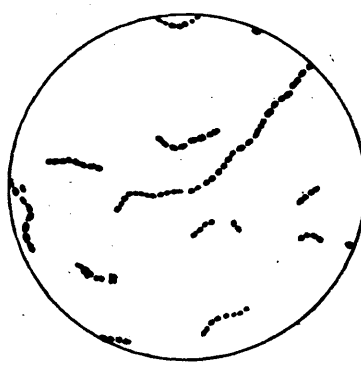


Б

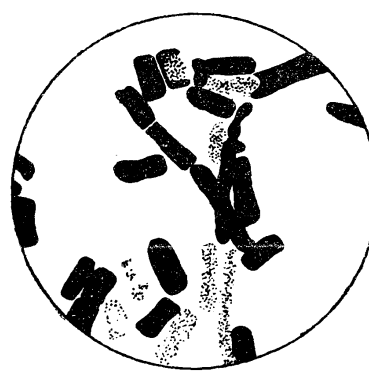
Рисунок 9.1 – А – Микрофлора кефира: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Saccharomyces kefir*; Б – микрофлора ацидофилина: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, x 100



А



Б



В

Рисунок 9.2 – А – Микрофлора капустного рассола; Б - *Streptococcus cremoris*; В – молочная плесень *Oidium lactis*, x 60

К группе гомоферментативных молочнокислых бактерий относятся также виды, обитающие на растительных субстратах (свекла, капуста, огурцы, силосная масса). Из них большой практический интерес представляет *Lactobacterium delbruckii* – длинная бесспорная палочка, растущая при повышенной температуре и применяющаяся для промышленного получения молочной кислоты. Широко распространены в природе *Bacterium cucumeris fermentatis* – маленькая палочка, встречающаяся в огуречном и капустном рассоле, а также близкая к ней *Lactobacterium plantarum*. Эти бактерии находят широкое практическое применение при квашении капусты, огурцов (рисунок 9.2 – А).

Представителями **гетероферментативных молочнокислых** бактерий являются переменные по форме бифидобактерии из рода *Bifidobacterium* (*B. bifidum*) и кокковые из рода *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Lactobacillus brevis*, *Bacterium coli* и др. Некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии (например, *Lactobacterium pentoaceticum*) могут сбраживать пентозы с образованием молочной и уксусной кислот, что имеет место при силосовании кормов. Накапливающиеся при этом кислоты предохраняют силос от порчи.

На поверхности прокисшего молока, капусты, кваса, силоса довольно часто развивается молочная плесень *Oidium lactis* (рисунок 9.2 – В), вызывающая порчу молочных и квашеных продуктов и силоса. Этот организм близко примыкает к дрожжам, но некоторыми исследователями относится к несовершенным грибам. Его вегетативное тело представлено белым многоклеточным мицелием, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, то овальной, то продолговатой формы, служащие для размножения.

Молочнокислые бактерии имеют огромное практическое значение, так как вызываемый ими процесс молочнокислого брожения лежит в основе переработки молочных продуктов, квашения овощей, силосования кормов. Молочнокислые бактерии либо продукты их метаболизма активно используют в мясной, рыбной, спиртовой, кожевенной промышленности, медицине и т.д.

3 Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий

В субстратах разной природы молочнокислые бактерии не занимают доминирующего положения, их рост подавляют различные

сапрофитные микроорганизмы (многие виды плесеней, дрожжей и т.д.). Поэтому для выделения таких микроорганизмов используют элективные питательные среды, которые способствуют их активному росту. Источниками для выделения лактококков служат кисломолочные продукты (сметана, простокваша, сыры, кефир и др.), лактобацилл – силос и травы, пищевые продукты. Например, в йогурте можно выделить *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*; в кефире – *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirianofaciens*; сметане – *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

Накопительную культуру молочнокислых бактерий можно получить очень просто. Для этого свежее покупное молоко разливают в пробирки или эрленмейеровские колбы емкостью 100–200 мм, наполняя их на 2/3 объема, закрывают ватными пробками и помещают в термостат с температурой 30–35 °С. Если используется стерильное молоко, то в него вносят кислое молоко пипеткой 1 мл на пробирку. После того, как в молоке образуется плотный сгусток, приступают к микроскопическому изучению молочнокислых бактерий и определению молочной кислоты.

4 Качественные реакции на молочную кислоту

Молочная кислота в кислом молоке или других продуктах брожения может быть определена качественными реакциями и количественными методами. Из качественных реакций на молочную кислоту наиболее надежными и специфическими являются: 1) перевод молочной кислоты в уксусный альдегид; 2) реакция с тиофеном.

1 Для **определения молочной кислоты** прокисшее молоко отфильтровывают через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата прибавляют 1 мл 10%-ного раствора серной кислоты, нагревают до кипения и добавляют по каплям 2%-ный раствор марганцевокислого калия (KMnO_4). При этих условиях молочная кислота почти нацело переходит в уксусный альдегид, который обнаруживается фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором азотнокислого серебра (AgNO_3). При нагревании колбы уксусный альдегид будет улетучиваться и, воздействуя на аммиачный раствор серебра, вызовет почерчение бумажки.

2 В пробирку наливают 1–2 мл исследуемого фильтрата и прибавляют 5 мл крепкой серной кислоты и 10 капель насыщенного

раствора медного купороса. Взболтав жидкость, нагревают ее в течение 5 мин на водяной бане при 100 °С. После охлаждения прибавляют несколько капель 0,1%-ного спиртового раствора тиюфена. В присутствии молочной кислоты получается вишнево-красное окрашивание.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Дайте характеристику молочнокислым бактериям, опишите их особенности, типы брожения.
- 2 Укажите особенности морфологии клеток молочнокислых бактерий. Как морфология клеток меняется с возрастом культуры?
- 3 Перечислите представителей типичного и нетипичного молочнокислого брожения.
- 4 Каким образом можно получить накопительную культуру молочнокислых бактерий?

Практическое занятие 9

Цель работы – изучение молочнокислых бактерий: их особенностей, морфологии, химизма процесса молочнокислого брожения.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, иммерсионное масло, предметные, бактериальные петли, кюветы, мостики, держатели, пинцеты, молоко, кисломолочные продукты, капустный или огуречный рассол, штативы для пробирок, стерильные пипетки, медицинские пипетки, спиртовки, смесь спирта с эфиром (1 : 1), марганцевокислый калий, серная кислота, медный купорос, жидкий ляпис, тиюфен, карболовый фуксин, фильтровальная бумага, фуксин основной, фуксин кислый, генциановый фиолетовый, карболовый, метиленовый синий, малахитовый зеленый, раствор Люголя, спирт 96°.

Ход работы

- 1 Ознакомиться со способами получения накопительной культуры молочнокислых бактерий.
- 2 Ознакомиться с качественными реакциями на молочную кислоту.
- 3 Приготовить фиксированные препараты молочнокислых бактерий с использованием: а) простой окраски; б) окраски по Граму. Для фиксации желательно использовать смесь спирта с эфиром (1 : 1),

что приводит к извлечению жира из приготовленного мазка, обеспечивая четкость препарата.

4 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Отметить форму и сочетание клеток согласно схеме таблицы 9.1. Сделать зарисовки.

5 Все наблюдения и рисунки отметить в таблице 9.1, записать в рабочую тетрадь. Под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 9.1 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Исследуемый материал	
Возраст культуры, материала	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Окраска по Граму	
Рисунок клеток	
Выводы:	

6 Указать в выводах морфологические особенности клеток микроорганизмов исследуемой культуры.

Тема 10 Спорообразующие бактерии: аэробные и анаэробные

- 1 Характеристика спорообразующих бактерий, отдельные представители
- 2 Основные свойства эндоспор
- 3 Получение накопительных культур аэробных спорообразующих бактерий
- 4 Получение накопительных культур анаэробных спорообразующих бактерий
- 5 Дифференциальная окраска споры и цитоплазмы

1 Характеристика спорообразующих бактерий, отдельные представители

В группу спорообразующих входят бактерии разной морфологии, большинство из них окрашивается по Граму положительно (таблица 10.1). Клетки обычно подвижные за счет перитрихальных жгутиков, образуют устойчивые к нагреванию, сильно преломляющие свет эндоспоры. В группу входят 15 родов, из них пять основных: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* и *Desulfotomaculum*.

Таблица 10.1 – Эубактерии, образующие эндоспоры (по Дуде, 1982)

Род бактерий	Форма вегетативных клеток	Окраска по Граму	Отношение к кислороду
<i>Bacillus</i>	палочковидная	±	аэробы
<i>Clostridium</i>	то же	±	анаэробы
<i>Desulfotomaculum</i>	то же	—	анаэробы
<i>Sporolactobacillus</i>	то же	+	аэробы
<i>Sulfolobus</i>	то же	—	то же
<i>Sporocarcina</i>	сферическая	+	то же
<i>Thermoactinomyces</i>	ветвящиеся нити	+	то же
<i>Actinobifida</i>	ветвящиеся нити	+	то же
<i>Sporospirillum</i>	спириллы	—	анаэробы
<i>Ostillospira</i>	дисковидные клетки в трихомах	—	то же
<i>Fusosporus</i>	спириллы	—	то же

Первичное таксономическое деление на роды основано на отношении бактерий к молекулярному кислороду. Род *Sporosarcina* включает облигатные аэробы и факультативные анаэробы. Представители рода *Desulfotomaculum* являются облигатными анаэробами, рода *Sporosarcina* – грамположительными кокковидными бактериями. Бактерии рода *Desulfotomaculum* по Граму окрашиваются отрицательно, хотя имеют клеточную стенку грамположительного типа, энергию получают путем анаэробного сульфатного дыхания, используя в качестве конечных акцепторов электронов сульфаты. Бактерии рода *Sporolactobacillus* – микроаэрофилы, клетки палочковидные, подвижные (жгутикование перитрихальное), грамположительные. Метаболизм бродильный, осуществляют гомоферментативное молочнокислое сбраживание гексоз с образованием молочной кислоты. Клетки не содержат каталазы и цитохромов. Типовой (и единственный) вид *Sporolactobacillus inulinus*.

К числу наиболее широко распространенных и имеющих значительный практический интерес спорообразующих бактерий относятся бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*.

К роду *Bacillus* относятся аэробные или факультативно-анаэробные палочковидные бактерии, большинство из них подвижны. Хемоорганотрофы. Метаболизм строго дыхательный, строго бродильный или дыхательный и бродильный одновременно, с использованием различных субстратов. Некоторые представители способны получать энергию за счет нитратного дыхания. Для большинства представителей рода *Bacillus* характерно брожение с образованием 2,3-бутандиола, глицерина и CO₂, а также небольших количеств молочной кислоты и этанола. Бутандиоловое брожение, осуществляемое бактериями рода *Bacillus*, можно представить следующим образом:



Бактерии рода *Bacillus* можно разделить на три группы, различающиеся по структуре и внутриклеточной локализации эндоспор:

1 Споры овальные, расположение их в материнской клетке центральное, растяжение клетки спорой не происходит. Таковы споры у большинства бацилл (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*).

2 Споры овальные, имеющие толстую оболочку с выростами, расположение их в материнской клетке центральное. Они «растягивают» клетки изнутри в ходе споруляции (*B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*).

3 Споры сферические, расположение их в материнской клетке полярное. Эндоспоры «растягивают» клетку в ходе споруляции (*B. pasteurii*).

Большинство представителей рода *Bacillus* являются сапрофитами, широко распространены в природе, особенно в почвах, богатых органическими веществами (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*). *B. megaterium* считаются «гигантами» среди эубактерий, так как их клетки имеют размеры 2×5 мкм. Вид *B. subtilis* является типовым для рода *Bacillus*, называется «сенной палочкой» (так как накопительные культуры данных бактерий получают из настоя сена). Бактерии *B. polymyxa* получили название из-за того, что они образуют большое количество слизи. *B. stearothermophilus* – выраженный термофил (температурный оптимум для роста 50–65 °C).

Представителями патогенных бацилл являются *B. anthracis* и *B. thuringiensis*. *B. anthracis* – возбудитель сибирской язвы. Это нуждающиеся в факторах роста неподвижные бактерии с пептидной капсулой, содержащей в большом количестве D- и L-формы глутаминовой кислоты. *B. thuringiensis* – возбудитель паралитического заболевания у гусениц многих чешуекрылых насекомых. Клетки этих бактерий подвижны, зависят от наличия факторов роста. Включения токсичных для насекомых белков известны и у других бацилл, например, у *B. laterosporus*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*.

Бактерии рода *Bacillus* являются активными продуцентами различных антибиотических веществ. В настоящее время известно около 200 антибиотиков, синтезируемых этими бактериями. Наиболее продуктивными являются бактерии вида *B. subtilis* – для них описано более 70 различных антибиотиков. Около 30 антибиотиков продуцируют культуры *B. brevis*. Различные антибиотики синтезируют также бактерии видов *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* и др. Некоторые антибиотики бактерий рода *Bacillus* широко используются в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. К ним относятся полимиксины, колистин, бацитрацин, грамицидин С, субтилин, эдеин, бутирозин и др.

Анаэробные спорообразующие бактерии рода *Clostridium* – палочки с закругленными или иногда заостренными концами, часто расположенные в парах или коротких цепочках. Большинство из них подвижны за счет перитрихальных жгутиков. Образуют овальные или сферические эндоспоры, располагающиеся субтерминально, центрально или терминально. Как правило, диаметр спор больше диаметра вегетативной клетки, поэтому палочка со спорой приобретает сходство с веретеном, отсюда и произошло название рода. Отличительной морфологической особенностью их является способность к синтезу гранулезы. Большинство штаммов рода *Clostridium* – облигатные анаэробы, хотя некоторые могут расти в присутствии воздуха. Хемоорганотрофы, энергию получают в основном за счет маслянокислого брожения. Возбудителями классического маслянокислого брожения являются *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. rubrum* и др. В качестве основных продуктов они образуют масляную и уксусную кислоты, углекислый газ и молекулярный водород. Другие представители (*C. acetobutyricum*, *C. felsineum*, *C. sporogenes* и др.) осуществляют ацетобутиловое брожение, при котором кроме масляной кислоты образуются нейтральные продукты: ацетон, бутиловый, этиловый, изопропиловый спирты.

Клостридии сбраживают большое число субстратов, включая полисахариды, белки, аминокислоты и пурины. В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридий:

- сахаролитические, использующие в качестве субстратов моносахара, крахмал, пектин, целлюлозу и другие вещества углеводной природы (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. felsineum*);
- протеолитические, сбраживающие белки, пептиды, аминокислоты (*C. botulinum*, *C. tetani*, *C. putribicum*, *C. sporogenes* и др.);
- пуринолитические, сбраживающие гетероциклические азотсодержащие соединения – пурины и пиримидины (*C. acidurici*, *C. cylindrosporum*).

Потребности клостридий в питательных веществах весьма разнообразны. Как правило, они могут расти только на сложных, богатых органическими соединениями средах. Для них выявлена потребность в определенных витаминах и наборе аминокислот. Для многих сахаролитических клостридий характерна способность

фиксировать атмосферный азот. Первый анаэробный азотфиксатор был выделен из почвы русским микробиологом С. Н. Виноградским и назван им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Клостридии широко распространены в природе. Естественной средой их обитания является почва, особенно ее глубокие слои, ил различных водоемов, сточные воды, кишечный тракт травоядных животных и человека. У клостридий выделяют как сапрофитные, так и патогенные формы. К сапрофитным относятся *C. pasteurianum*, *C. acetobutyricum*, *C. butyricum* (типовой вид рода *Clostridium*). Патогенные клостридии: *C. tetani* – возбудитель столбняка; *C. botulinum* – возбудитель ботулизма; *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordelli* – возбудители газовой гангрены. Патогенные клостридии, как правило, относятся к протеолитическим.

Бактерии рода *Clostridium* играют важную роль в круговороте веществ в природе, особенно азота и углерода, осуществляя процессы гниения, брожения и фиксации молекулярного азота. Некоторые представители клостридий используются для промышленного получения масляной кислоты, бутанола, ацетона (*C. butyricum*, *C. acetobutyricum*). Анаэробные клостридии применяются также при мочке льна, конопли и других прядильных культур.

Разложение пектиновых веществ в процессе минерализации растительных тканей приводит к быстрому распаду растительных остатков в почве. Основные возбудители пектинового брожения – *C. pectinovorum*, *C. felsineum*, *C. pectinovorum* – крупные палочковидные бактерии, размером 10–12 x 0,8 мк. При спорообразовании принимают вид длинных плектридиальных форм палочек с прерывистым расположением гранулезы. *Clostridium felsineum* имеет вид палочек меньшего размера, сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза заполняет всю клетку за исключением конца клетки, где располагается спора. Пектин разлагает более активно. Оба представителя живут в строгих анаэробных условиях. Очень подвижны и способны образовывать споры. Содержат фермент пектиназу. При гидролизе пектина этими бактериями энергия (АТФ) выделяется в результате сбраживания продуктов ферментативного гидролиза пектина.

2 Основные свойства эндоспор

Эндоспоры бактерий – особый тип покоящихся клеток, в основном грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются

эндогенно, т. е. внутри материнской клетки, которая называется **спорангием**.

Отличия бактериальной эндоспоры от вегетативной клетки:

- 1) характеризуется повышенной устойчивостью к нагреванию, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и других факторов;
- 2) споры некоторых бактерий выдерживают кипячение на протяжении двух часов;
- 3) могут длительное время сохраняться в состоянии покоя;
- 4) обладают низким уровнем метаболической активности либо ее отсутствием.

Поскольку одна клетка образует одну эндоспору и увеличения числа бактерий при ее прорастании не происходит, то **спорообразование не рассматривают как способ размножения бактерий**. Эндоспоры представляют собой стадию покоя, приспособлены к перенесению неблагоприятных условий.

Переход бактерий к **спорообразованию (споруляции)** наблюдается обычно при истощении питательного субстрата, недостатке источников углерода, азота, фосфора, изменении pH и т. д. Процесс спорообразования энергозависим, поэтому от источника поступления энергии споруляцию разделяют на эндотрофную и экзотрофную. Эндотрофная споруляция осуществляется за счет внутреннего запаса энергии клетки и не нуждается в дополнительных веществах. В случае экзотрофных процессов используется экзогенная энергия, поступающая извне. Способность к образованию спор детерминируется генами *spo*, которых у бактерий *Bacillus subtilis* (по данным Г. Халворсена) более 100. Каждый из *spo*-генов отвечает за те или иные стадии споруляции.

В конце спорообразования спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке. Диаметр споры может превышать или не превышать диаметр вегетативной клетки. В результате этого бактериальная клетка со спорой может принимать форму веретена или теннисной ракетки. Споры в клетке могут располагаться центрально (*Bacillus megaterium*), субтерминально (*Clostridium botulinum*) или терминально (*Clostridium tetani*).

Обычно суспензии спорообразующих микроорганизмов содержат в разных соотношениях: споры, вегетативные клетки, вегетативные клетки с эндоспорами. Поэтому перед каждым пересевом культуру, как правило, подвергают кратковременному кипячению. Это способствует сохранению или повышению способности клеток формировать споры. Споры освобождаются при лизисе спорангия.

Проращивание спор в вегетативную клетку можно индуцировать, подвергнув их прогреванию до 60–70 °С в течение нескольких минут или кратковременному кипячению (10 мин при 100 °С). Тепловой шок должен проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим.

Для обнаружения способности клеток к спорообразованию лучше всего использовать старые культуры. Споры можно обнаружить при наблюдении живых клеток, а также путем дифференциального окрашивания цитоплазмы и споры. С этой целью просматривают клетки 2–3-суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры.

Споры обладают многослойными труднопроницаемыми для красителей оболочками, поэтому при простом методе окрашивания обнаруживаются в клетке в виде бесцветных включений, обычно сферической или овальной формы, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий. Иногда на поверхности спор откладывается тонкий белковый слой. Благодаря его прокрашиванию, споры становятся видимыми, но окрашены они значительно слабее, чем клетки. Например, при окраске фуксином Цилия клетки красные, а споры светло-розовые.

Метод простого негативного окрашивания удобен при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста. Можно также провести дифференциальную окраску спор и цитоплазмы.

3 Получение накопительных культур аэробных спорообразующих бактерий

О развитии накопительной культуры судят визуально по характерным признакам изменения питательной среды, образованию пленки, выделению пигмента, появлению мути, образованию газов, а также по микроскопированию микроорганизмов на прижизненных и постоянных микробиологических препаратах.

Получение культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*)

Вариант 1. Помещают 1 г сена из разнотравья (мелко нарезают) в колбу объемом 100–150 мл и заливают 20–30 мл водопроводной воды, нагретой до 40–50 °С. Сено настаивают в течение 30 мин. За это время из сена экстрагируются вещества, которые служат питательным

субстратом для бактерий. Через 30 мин сенной настой отделяют от сена фильтрацией, разливают в 2 пробирки (примерно по 5–7 мл), закрывают их ватными пробками и прогревают в кипящей водяной бане 15–20 мин. При этом лишь споры некоторых бактерий остаются жизнеспособными. Колбы помещают в термостат при температуре 30 °С на 7 суток.

Вариант 2. При втором способе, конические колбы на 100–150 мл заранее проваривают, кипятя в них воду 15–20 мин. Сено из разнотравья мелко нарезают и помещают в колбу объемом 500 мл, заполняя ее на $\frac{1}{4}$ объема, добавляют щепотку мела и кипятят 15–20 мин, пока среда не приобретает цвет настоя крепкого чая. Сенной отвар разливают в подготовленные конические колбы слоем 1,0–1,5 см (должен быть тонкий слой суспензии, поскольку ставим накопительную культуру аэробных спорообразующих бактерий), закрывают ватными пробками и помещают в термостат при температуре 22–25 °С либо вблизи радиатора отопления.

Характеристика культуры сенной палочки (*Bacillus subtilis*). Наблюдают на поверхности жидкости бактериальную пленку. Это культура сенной палочки (*Bacillus subtilis*), которая при старении, на 3–4-е сутки, становится серовато-зеленоватой. Другие микроорганизмы при этом вырастают редко и в небольших количествах.

При культивировании на плотной среде колонии сухие, бесцветные или серовато-белые, мелкоморщинистые или образующие бархатистый налет, расплывающиеся по поверхности агара и тогда имеющие по краям складки; край более или менее волнистый; плотно прилегают к агаровой среде. Клетки имеют форму палочки, короткие и тонкие, размером 3–5х0,6 мкм; нередко соединены в длинные нити. Споры овальные (0,9х0,6 мкм), расположены без строгой локализации – эксцентрично или ближе к центру, но не строго центрально.

Получение культуры картофельной палочки (*Bacillus subtilis* var. *mesentericus*). Нарезают неочищенный клубень картофеля на среднего размера ломтики, помещают их в колбу объемом 100–150 мл, добавляют на кончике шпателя мел, заливают ломтики водопроводной водой почти доверху колбы. Колбы ставят на водяную баню и прогревают в кипящей водяной бане 10–15 минут. При этом вегетативные клетки бактерий, находящихся на поверхности клубней картофеля, погибают, а жизнеспособными обычно остаются лишь термостабильные споры. Затем колбы закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при 30 °С на 5–7 суток.

Характеристика культуры *Bacillus subtilis* var. *mesentericus*. Проверяют получение накопительной культуры спорообразующих бактерий по появлению на поверхности жидкой среды плотной морщинистой пленки культуры картофельной палочки. Окраска пленки может быть разной: беловато-серой, розовой, желто-бурой, черной, что зависит от разновидностей культуры, получивших преимущественное развитие. На плотной среде колонии обычно плотно прилегают к ее поверхности, иногда срастаются со средой, тонкие, морщинистые, серовато-белые, кремовые или желто-бурые. Культура имеет много разновидностей. Клетки имеют форму палочки, тонкие, длинные и короткие, размером 3–10х0,5–0,6 мкм, одиночные или соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые (0,9х0,5 мкм), могут располагаться в любой части клеток. При формировании спор клетки не раздуваются.

4 Получение накопительных культур анаэробных спорообразующих бактерий

Вариант 1. Наиболее распространен и удобен метод, который состоит в следующем. Из льняной соломки (или стеблей крапивы) готовят снопики, перевязанные в двух местах ниткой. Высота снопики 5–6 см. Помещают их в пробирки, заливают водопроводной водой. Для того чтобы снопик не всплывал, сверху помещают какой-нибудь грузик или внутри снопики укрепляют стеклянную трубочку. Кипятят на водяной бане в течение 3 минут от начала кипения для удаления экстрактивных веществ. Либо кипятят 10–15 мин на электроплитке. Затем воду из пробирки сливают и вновь наполняют пробирки водопроводной водой. Закрывают ватными пробками, вторично нагревают до кипения, помещают в термостат на 6–7 суток при температуре 30–35 °С для развития бактерий. Для приготовления препаратов снопик вынимают из пробирки в фарфоровую чашку и разрезают его. Из одной или нескольких соломинок пинцетом выдавливают из одного конца каплю жидкости на предметное стекло и, накрыв покровным стеклом, микроскопируют, под микроскопом будет видно большое количество клеток палочковидной формы.

Готовность накопительной культуры определяется по помутнению среды и газообразованию, а кроме того, по всплыванию снопики на поверхность питательной среды. Уже в первые сутки на поверхности жидкости появляется пена – это так называемое пенное брожение, при котором сбраживаются не пектин, а сахаристые

вещества, извлеченные из стебля водой. Основную роль в пенном брожении играют бактерии-спутники, например, молочнокислые и образующие газ бактерии, близкие к кишечной палочке.

Вариант 2. Маслянокислые бактерии рода *Clostridium* можно выделить из сыра и почвы, а также из силоса. Например, достаточно внести кусочек сыра в сахарную среду с мелом и выдержать пробу в термостате. Через сутки в пробирке, зараженной сыром, уже начинается брожение – и при микроскопировании препарата будут заметны маслянокислые бактерии.

5 Дифференциальная окраска споры и цитоплазмы

Споры и цитоплазму окрашивают при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

Небольшое количество суспензии клеток спорообразующих бактерий помещают пипеткой на предметное стекло и делают мазок. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру (окраска спор и цитоплазмы **по методу Пешкова**). Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло пинцетом над пламенем горелки. По мере испарения красителя, для предотвращения формирования кристаллов, добавляют новые его порции. Продолжительность окраски 10–20 с. Затем предметное стекло охлаждают. Препарат тщательно промывают над ванночкой водой. После чего клетки в течение 30 с докрашивают 0,5%-м водным раствором сафранина. Краситель сливают, препарат промывают водой, сушат и просматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании вегетативные клетки имеют красный, а споры – синий цвет.

Вместо метиленового синего можно использовать другой краситель, например, малахитовый зеленый (**метод Шеффера-Фултона**). В этом случае после фиксации препарат заливают на 7–10 мин 7,5%-м раствором малахитового зеленого. Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой либо над пламенем горелки, и докрашивают клетки 0,25%-м раствором сафранина в течение 1–2 мин. Споры окрашиваются в зеленый цвет, вегетативные клетки – в розовый.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Дайте краткую характеристику спорообразующих бактерий.
- 2 Назовите типовой вид родов *Bacillus* и *Clostridium*.
- 3 Охарактеризуйте бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*.
- 4 Перечислите основные отличия бактериальной эндоспоры от вегетативной клетки?
- 5 Перечислите особенности строения и химического состава эндоспор.
- 6 Охарактеризуйте способы получения накопительных культур аэробных и анаэробных спорообразующих бактерий.
- 7 Перечислите основные этапы образования и прорастания спор, охарактеризуйте их. Какое положение занимает созревшая эндоспора в клетке?

Практическое занятие 10/1

Получение накопительных культур спорообразующих бактерий

Цель работы: ознакомление с методами получения накопительных культур аэробных и анаэробных спорообразующих бактерий.

Материалы и оборудование: маркер, клубни картофеля, сено, стебли крапивы или льна, ножницы, нитки, конические колбы на 100 и 250 мл с пробками, пробирки стерильные с пробками, мел, электроплитка, водяная баня.

Ход работы

- 1 Ознакомиться с методами получения накопительных культур аэробных и анаэробных спорообразующих бактерий.
- 2 Приготовить накопительные культуры аэробных и анаэробных спорообразующих бактерий в соответствии с п. 2–3 данного руководства.
- 3 Поместить колбы (пробирки) с материалом в термостат при 30 °С на 5–7 суток.

Практическое занятие 10/2

Выявление эндоспор

Цель работы: ознакомление со строением зрелой споры и методами выявления эндоспор.

Материалы и оборудование: микроскопы биологические, предметные и покровные стекла, спиртовки, иммерсионное масло, стерильные пипетки, пинцеты, держатели, фильтровальная бумага, спички, стерильная водопроводная вода, стеклянные палочки, раствор Люголя, набор готовых растворов красок в штативе, спирт 96⁰, кюветы, мостики.

Ход работы

1 Рассмотреть рисунок 10.1. Зарисовать схему строения зрелой споры в рабочую тетрадь. Перечислить основные структурные элементы эндоспоры; указать происхождение каждого покровного слоя споры: цитоплазматической мембраны, клеточной стенки зародыша, кортекса, внутренней оболочки споры, наружной оболочки споры, экзоспориума.

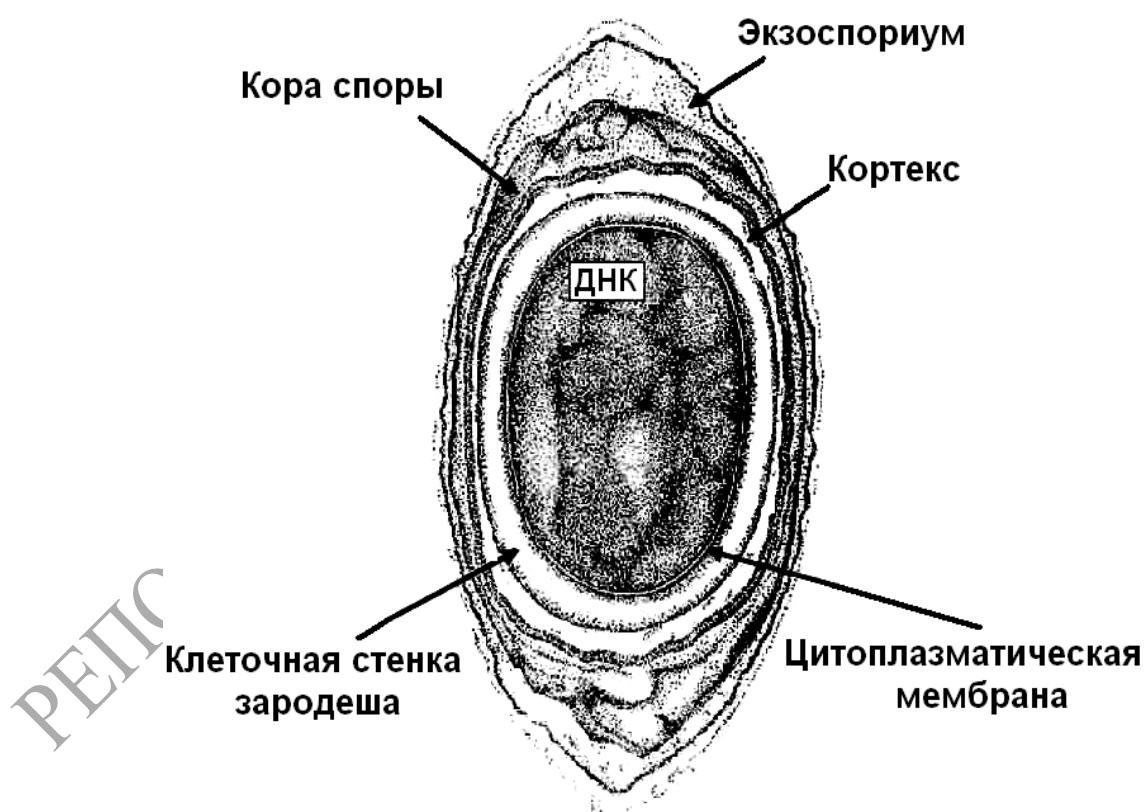


Рисунок 10.1 – Схема строения зрелой споры (по С.Халею, 2001)

2 В соответствии с предложенным для исследования вариантом накопительной культуры, полученной на предыдущем занятии,

рассмотреть образовавшуюся пленку, и описать ее внешний вид согласно схеме таблицы 10.2.

3 Полученные результаты записать в таблицу 10.2.

Таблица 10.2 – Особенности накопительной культуры спорообразующих бактерий

Свойства	Наблюдаемые особенности
Накопительная культура, материал	
Возраст культуры	
Внешний вид пленки на поверхности среды	
Окраска пленки	

4 Приготовить препараты «раздавленная капля» и фиксированные (окрашенные по методу Пешкова и по Граму).

**При окраске по методу Пешкова, следует прогреть в огне.*

5 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Определить форму и сочетание клеток, подвижность, наличие или отсутствие спор. Сделать зарисовки.

6 Все наблюдения и рисунки отметить в таблице 10.3, записать в рабочую тетрадь. Под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 10.3 – Некоторые особенности морфологии клеток спорообразующих микроорганизмов

Параметры	Характеристика
Накопительная культура	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Подвижность	
Окраска по Граму	
Наблюдаемые типы клеток	
Форма и положение эндоспор в вегетативных клетках	
Рисунок клеток	
Выводы:	

7 Сделать выводы о морфологии клеток и наблюдаемых типах клеток исследуемой культуры; указать форму и положение эндоспор в вегетативных клетках.

Тема 11 Выявление и количественный учет микроорганизмов почвенной микрофлоры

- 1 Характеристика почвы как субстрата для развития разнообразных микроорганизмов
- 2 Основные этапы работы по изучению почвенной микрофлоры
- 3 Основные группы микроорганизмов, выявляемые при высеве из почвы на МПА
- 4 Выявление различных физиологических групп микроорганизмов

1 Характеристика почвы как субстрата для развития разнообразных микроорганизмов

Почва является одним из наиболее благоприятных субстратов для развития самых разнообразных микроорганизмов. Количество микроорганизмов в 1 г почвы может насчитывать сотни миллионов, даже миллиарды клеток. Особенно многочисленны и разнообразны микроорганизмы вокруг корневых систем (в ризосфере) и на поверхности корней (ризоплане) растений. Численность и качественный состав почвенной микрофлоры зависят от типа и агротехнической обработки почвы, вида и возраста растений, времени года и других факторов.

С жизнедеятельностью микроорганизмов почвы связаны многие протекающие в ней процессы, в первую очередь – круговорот биогенных элементов. Чрезвычайно велика роль микроорганизмов в минерализации животных и растительных остатков, а также в обогащении почвы доступными для растений формами азота. С деятельностью микроорганизмов связано плодородие почвы. Таким образом, почвенные микроорганизмы оказывают большое влияние на жизнь растений, а тем самым на животных и человека, являясь одним из обязательных звеньев общей экосистемы. Знание количества микроорганизмов, населяющих почву, в том числе представителей отдельных физиологических групп, и оценка процессов, осуществляемых ими, необходимы для понимания роли микроорганизмов в природе.

Для определения общего количества микроорганизмов в различных субстратах, выявления и учета численности представителей отдельных групп и видов микроорганизмов, применяют ряд методов. К ним относятся: прямой подсчет клеток под

микроскопом (в счетных камерах, на фиксированных окрашенных препаратах, на мембранных фильтрах), выделение и учет высевом на плотные (чашечный метод Коха) и в жидкие (метод предельных разведений) питательные среды.

Методы прямого счета клеток под микроскопом дают возможность учесть численность микроорганизмов в субстрате наиболее полно. Однако при этом определяются как живые, так и мертвые клетки, поэтому результаты подсчета могут быть не совсем точными. Также наблюдение микроорганизмов под микроскопом не позволяет судить о процессах, которые они проводят в данном субстрате.

Методами высева на плотные и в жидкие питательные среды учитываются только жизнеспособные клетки микроорганизмов. Если хотят выделить и учесть как можно более широкий круг микроорганизмов, населяющих данный субстрат, используют метод Коха и при этом подбирают такую по составу среду, на которой способны развиваться микроорганизмы с различными свойствами. Однако на одной среде не удастся выявить все группы микроорганизмов субстрата вследствие существенных физиологических и биохимических различий между ними. В основе выделения и определения численности представителей отдельных групп микроорганизмов лежит получение накопительных культур с помощью создания селективных условий.

2 Основные этапы работы по изучению почвенной микрофлоры

Чтобы иметь общие представления об изучении почвенной микрофлоры следует освоить следующие этапы работы:

1) отбор почвенных образцов и подготовка их к микробиологическому анализу; 2) методы определения количества микроорганизмов путем высева на питательные среды и прямым счетом микроорганизмов в почве; 3) изучение качественного состава и морфологии микроорганизмов микроскопическими методами.

2.1 Отбор почвенных образцов для микробиологических исследований

При исследовании микрофлоры почвенных горизонтов делают почвенный разрез. Перед взятием проб снимают поверхностный слой почвы на глубину 1 см. Пробы берут чистым инструментом по слоям

и горизонтам почвы. Инструменты можно не стерилизовать, но они должны быть чистыми и перед взятием пробы протерты почвой соответствующего горизонта.

При других почвенно-микробиологических исследованиях берут смешанные пробы. Смешанная проба составляется из индивидуальных образцов (до 0,5 кг), взятых цилиндрическим буром, не меньше, чем с пяти точек поля по одной или двум диагоналям. Чем больше площадь поля, тем больше надо брать индивидуальных проб. Размер индивидуальных образцов должен быть примерно одинаковым. На чистой клеенке или листе бумаги их смешивают и берут среднюю пробу весом 0,5–1,0 кг. Пробы помещают либо в стерильную банку с крышкой, либо в стерильный пергаментный мешок или полиэтиленовый пакет. Для каждой пробы пишут простым карандашом подробную этикетку, в которой обозначают дату взятия образца, точное название поля, горизонт, с которого взята проба, отмечают особенности выбранного участка (рельеф, растительность, агротехнический фон). До анализа и между определениями, пробы хранят в холодильнике.

2.2 Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу

Хорошо перемешанную почву высыпают на сухое стекло, протертое спиртом и обожженное пламенем горелки. Почву тщательно перемешивают шпателем и раскладывают ровным слоем. Пользуясь пинцетом, удаляют корешки и другие посторонние включения. Непосредственно перед работой шпатель и пинцет стерилизуют прокаливанием на пламени спиртовки, остужают. Из разных мест распределенной на стекле почвы шпателем отбирают небольшие порции и в стерильной, предварительно тарированной фарфоровой чашке взвешивают на технических весах 1 г среднего образца.

Для разрушения почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с почвенных частиц пробу подвергают специальной обработке. Заранее готовят две стерильные колбы емкостью до 250 мл: одну со 100 мл стерильной водопроводной воды, другую оставляют пустой. Берут из первой колбы 0,4–0,8 мл воды, увлажняют ею навеску почвы в фарфоровой чашке до пастообразного состояния и смесь растирают 5 мин стерильным пестиком. Водой из первой колбы переносят растертую почвенную массу в пустую колбу,

используя для этого весь объем воды. Почву растирают и переносят в колбу около пламени горелки (следует учесть, что все операции проводят быстро, вблизи пламени спиртовки). Колбу с почвенной суспензией встряхивают на качалке в течение 5 мин (либо выполняют эту операцию энергично вручную). После этого суспензии дают отстояться 30 с, чтобы осели крупные частицы, и тотчас же используют ее для приготовления разведений. При этом учитывают, что в полученной исходной суспензии исследуемый материал разведен в 100 раз ($1 : 10^2$).

Приготовление разведений. Разведения делают в стерильном 0,5%-ном водном растворе NaCl. Заранее готовят определенный объем этого раствора (около 100 мл) и стерилизуют его при 1 атм. Чаще всего делают десятичные разведения (рисунок 11.1).

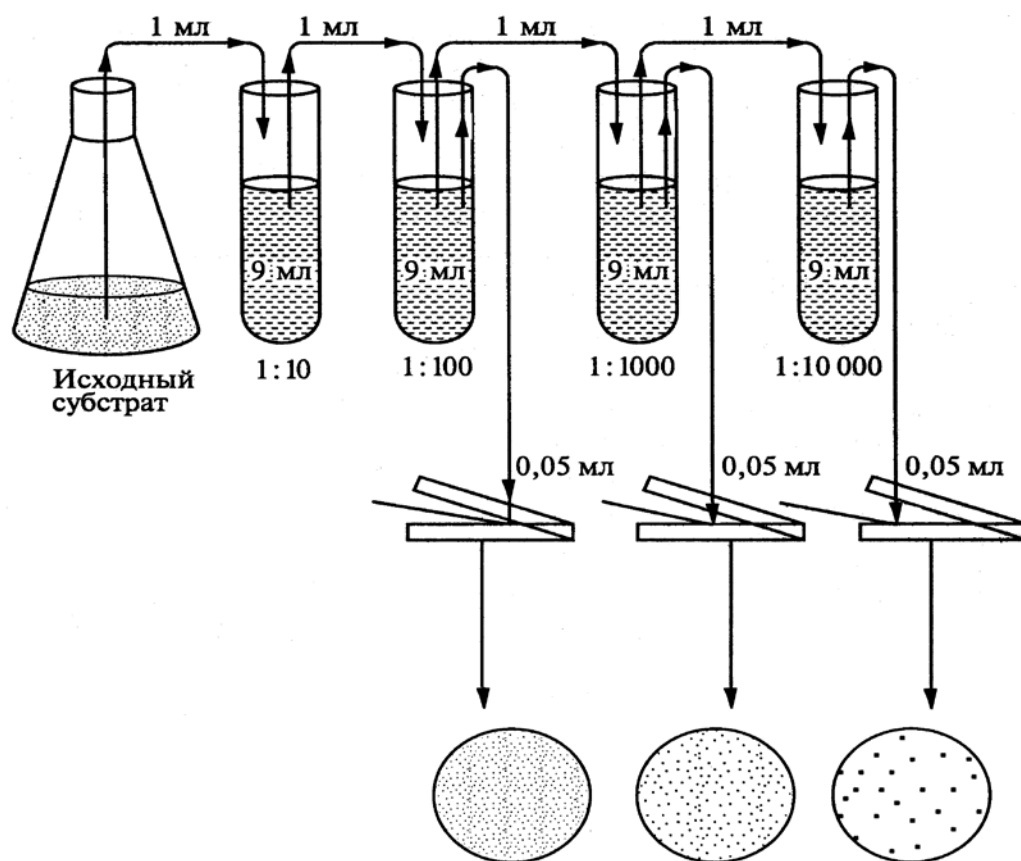


Рисунок 11.1 – Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

Для этого стерильный раствор NaCl разливают стерильной пипеткой по 4,5 мл в стерильные пробирки. Затем переносят

стерильной пипеткой 0,5 мл исходной суспензии ($1 : 10^2$), получают разведение $1 : 10^3$. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают с помощью новой стерильной пипетки, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру повторяют до 5 раз. Затем этой же пипеткой берут 0,5 мл полученного разведения и переносят его во вторую пробирку – это разведение $1 : 10^4$. Таким образом готовят и последующие разведения: $1 : 10^5$, $1 : 10^6$, $1 : 10^7$, $1 : 10^8$, $1 : 10^9$, $1 : 10^{10}$. Для приготовления каждого разведения обязательно используют отдельную пипетку. Пренебрежение этим правилом может привести к искажению результатов в 100 и более раз.

Полученные после разведения суспензии микроорганизмов используют для определения количества микроорганизмов путем посева на различные питательные среды и/или для учета численности микроорганизмов методом прямой микроскопии, а также для изучения качественного состава и морфологии микроорганизмов микроскопическими методами.

2.3 Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Шульгина-Брида)

Этот метод применяется в различных модификациях для определения численности микроорганизмов в разнообразных естественных субстратах – почве, загрязненной воде, оптически непрозрачных средах. Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках сводится к тому, что в определенном объеме исследуемой суспензии непосредственно под микроскопом подсчитывают количество клеток микроорганизмов. Использование фиксированных мазков дает возможность сохранять препараты длительный срок и проводить подсчет не по ходу опыта, а в удобное для исследователя время.

Приготовление препарата: 0,01 мл (либо от 0,02 до 0,05 мл) исходной суспензии почвы ($1 : 10^2$) либо других разведений наносят на чистое и обезжиренное предметное стекло. В некоторых случаях добавляют каплю 0,03–0,1%-го водного раствора агара. Суспензию распределяют с помощью бактериальной петли равномерно на площади в 4–6 см² (можно под стекло положить миллиметровую бумагу с хорошо очерченным квадратом). После просушивания препарат фиксируют 10–20 мин 96%-ным спиртом. Красят карболовым раствором эритрозина в течение 20–30 мин. Для этого стекло помещают в стакан с красителем. Можно прокрасить другими

красителями в течение 5 мин. Затем окрашенные препараты осторожно промывают (желательно погружением стекла в 4–5 сосудов с водой) и высушивают.

Правила подсчета. Подсчет клеток микроорганизмов проводят с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки, которую вставляют в окуляр. Просчитывают 50–100 квадратов сетки (не менее 10 полей зрения, а для получения достоверных результатов – не менее 100 полей зрения), передвигая препарат по диагонали. При отсутствии окулярной сетки можно подсчитывать клетки микроорганизмов на всей площади поля зрения микроскопа.

Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл (1 г) исследуемого материала, вычисляют по формуле:

$$M = \frac{A \times S}{V \times s} \times n,$$

где М – количество клеток в 1 мл; А – среднее число клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); s и S – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) и приготовленного мазка в мкм², соответственно; V – объем нанесенной на стекло суспензии в мл; n – разведение исследуемого материала.

Площадь квадрата сетки, или поля зрения, определяют с помощью объект-микрометра, который помещают на столик микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения. Площадь поля зрения вычисляют по формуле $S = \pi \times r^2$.

Пример пересчета: если площадь окулярной сетки равна 0,04 мм², то на площади препарата, равной 4 см², площадь окулярной сетки поместится 10 000 раз и, если на площади сетки было в среднем 10 бактериальных клеток, то в препарате будет 10 000 × 10 = 100 000 клеток. На площадь в 4 см² было нанесено 0,01 мл почвенной суспензии разведения 1 : 10² или 0,0001 г почвы. Следовательно, в 1 г почвы содержится 100 000 × 10 000 = 1 000 000 000 микробных клеток.

3 Основные группы микроорганизмов, выявляемые при высеве из почвы на МПА

В качестве питательной среды для культивирования микроорганизмов почвы очень часто используют мясо-пептонный агар (МПА) либо «Сухой питательный агар для культивирования микроорганизмов». Это богатые питательными веществами среды, на которых развиваются многие гетеротрофные микроорганизмы. При высеве из почвы на МПА вырастают микроорганизмы различных систематических и физиологических групп: грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, грамположительные спорообразующие палочки рода *Bacillus*, кокки родов *Micrococcus* и *Sarcina*, различные микобактерии (род *Mycobacterium*), некоторые высшие актиномицеты (род *Streptomyces*) и мицелиальные грибы (род *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др.).

Бактерии рода *Pseudomonas* образуют на МПА колонии круглые и неправильной формы, средние, крупные и широко распространяющиеся по поверхности среды, выпуклые и плоские, слизистые и пастообразные, просвечивающиеся, бесцветные или пигментированные (серые, синие, красные, желтые, бурые, черные и т.д.). У некоторых видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая ее. Пигментообразование зависит от состава и pH среды. Клетки псевдомонад прямые или слабо изогнутые, часто с заостренными концами, располагаются одиночно, парами, короткими цепочками, подвижны, имеют полярные жгутики (монотрихи или лофотрихи). Размеры клеток различных видов колеблются в пределах 0,7–7,5х0,3–1,5 мкм.

Виды рода *Flavobacterium* образуют на МПА колонии 2–3 мм в диаметре, круглые, редко – неправильной формы, гладкие, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду. Клетки флавобактерий – мелкие (0,3–4,5х0,2–1,0 мкм), слегка искривленные, подвижные (перитрихи) или неподвижные палочки, расположенные одиночно, в парах или цепочках.

Представители рода *Achromobacter* вырастают на МПА в виде мелких, гладких или сухих колоний, белого или серого цвета. Это мелкие палочки (0,5–2,3–5,8х0,1–1,0 мкм), одиночные, в парах, реже – в цепочках, неподвижные или подвижные (перитрихи).

Виды рода *Micrococcus* образуют на МПА разнообразные колонии: чаще – мелкие и средних размеров (2–4 мм в диаметре), но у некоторых видов – широко разрастающиеся по поверхности среды; матовые, влажные, блестящие и даже маслянистые; плоские и выпуклые; гладкие, зернистые, мелкоскладчатые, бугристые, радиально исчерченные; пастообразной консистенции, иногда

слизистые, реже сухие и плотные; чаще белые, серые, реже бесцветные, иногда буроватые, желто-зеленые, розовые и красные. Пигменты не диффундируют в питательную среду. Клетки круглые, мелкие, 0,2–1,5 мкм в диаметре, одиночные, парные, в виде разных скоплений. Клетки чаще всего неподвижны.

Род *Mycobacterium*. Колонии микобактерий на МПА растут медленно. Вначале они мелкие, круглые, компактные, но постепенно увеличиваются и в отдельных случаях довольно широко разрастаются по поверхности среды. Колонии мягкие, пастообразные, слизистые, растекаются по субстрату, иногда сухие и крошатся, бугристые или складчатые, с concentрическим кольцом; матовые, влажные или блестящие; белые или ярко окрашенные. Пигменты в субстрат не выделяются. Клетки микобактерий с возрастом меняются. Клетки в молодой культуре палочковидные, обычно искривленные, различных размеров, чаще в пределах 3,0–7,0х0,7 мкм. С возрастом клетки большинства видов распадаются на кокки или овальные клетки.

Род *Bacillus*. Типовой вид – *B. subtilis*. Колонии сухие, бесцветные или сероватые, кремовые, или образующие бархатистый налет, имеющие иногда складчатость; края более-менее волнистые; плотно прилегают к агаровой среде. Палочки короткие и тонкие, размером 3–5х0,6 мкм; нередко соединены в длинные нити. Споры овальные, размером 0,9х0,6 мкм, расположены без строгой локализации.

Актиномицеты (род *Streptomyces*). На плотных агаризованных средах актиномицеты образуют плотные кожистые колонии различной структуры и внешнего строения – гладкие, бугристые, бородавчатые, плоские, пленчато-морщинистые, пушистые, с мучным налетом. Колонии сростаются с субстратом при помощи субстратного мицелия – нитей, отходящих от нижней поверхности колонии и развивающихся в толще среды, поэтому практически не снимаются с поверхности агара бактериальной петлей. На поверхности колоний вырастает воздушный мицелий, на концах которого образуются спораносцы со спорами. Культуры актиномицетов пигментированы в разнообразные яркие цвета или бесцветны.

4 Выявление различных физиологических групп микроорганизмов

Для выявления микроорганизмов различных физиологических групп и их количественного учета пользуются методом предельных разведений. Численность микроорганизмов выявляется высевом

почвенной суспензии разных разведений на ряд питательных сред. При многократных анализах почвы в течение вегетационного периода можно выявить динамику развития ведущей и сопутствующей микрофлоры почвы. Посевы почвенной взвеси на жидкие и плотные среды производят из каждого разведения не менее чем в 2 пробирки или чашки Петри.

Количество выросших колоний можно подсчитать при глубинном высеве на МПА. Счет колоний ведут на 3-и и 5-е сутки. Подсчитывают чашки с посевами только тех разведений, где выросло не больше 50 и не менее 20 колоний. Однако при таком посеве нельзя систематизировать колонии по характерным признакам, поскольку они вырастают во всей толще агара. Если задачей исследования является систематизация микрофлоры по типу колоний, то производят поверхностный посев 0,5 мл почвенной суспензии.

Наличие **аммонифицирующих бактерий** можно определить высевом почвенной взвеси разных разведений на пептонную воду. На этой среде выявляются бактерии, способные разлагать белки и близкие им соединения. Признаками процесса развития аммонифицирующих бактерий являются помутнение среды, образование пленки, осадка и положительная реакция на аммиак с реактивом Несслера (производится на 5–7-й день). Наблюдения за изменением среды ведутся через 1, 3, 5 и 7 дней после посева.

Наиболее показательными микроорганизмами, присущими процессу разложения растительных остатков, являются грибы и маслянокислые бактерии.

Количество **грибов** определяют на сусло-агаре (СА) с pH 3,5–4,0 или на синтетической среде Чапека. На сусло-агаре особенно четко выявляются грибы из родов аспергиллус и пенициллиум, а также образование грибами пигментов. Посев на среду производится так же как и на МПА, подсчет колоний плесеней проводят на 3-й и 5-й день.

Общее количество **маслянокислых бактерий** определяют путем посева на жидкую картофельную среду. Общим признаком развития маслянокислых бактерий является газообразование. Показателем также характер роста, прозрачность среды, пигментация и мацерация картофеля. Наблюдения за газообразованием проводятся на 3, 5 и 7-й день, а описание остальных признаков на 7-й день. Характер роста и микроскопические наблюдения облегчают дифференциацию по типам возбудителей маслянокислого брожения.

Анаэробные бактерии, разлагающие целлюлозу, хорошо выявляются на среде Имшенецкого. Процесс анаэробного разложения

клетчатки сопровождается газообразованием, пигментацией и разрушением клетчатки: бумага либо разлагается, либо теряет упругость в нижней части полоски. Наблюдение за газообразованием и разрушением клетчатки производят на 7, 10, 15-й день, микроскопирование для характеристики развившейся микрофлоры – на 10–15-й день. Выявление этой группы бактерий представляет особый интерес при исследовании болотных почв.

Для выявления **аэробных бактерий, разлагающих клетчатку**, применяют пластинки кремнекислого геля с кружком стерильной фильтровальной бумаги, пропитанной средой С.Н. Виноградского. Посев производят по поверхности кружка бумаги, равномерно распределяя посевной материал. Наблюдения за развитием аэробных бактерий, разлагающих клетчатку, ведутся через 5–10 и 15 дней, иногда через 20 дней. В эти сроки отмечают количество колоний, их окраску, глубину распада целлюлозы и микроскопическую картину. Препараты окрашивают карболовым эритразином и микроскопируют.

Нитрифицирующие бактерии легко выявляют высевом различных разведений почвенной суспензии на кремнекислые пластинки с аммонийномагниевой солью фосфорной кислоты. О наличии нитрифицирующих бактерий судят по реакции на азотистую и азотную кислоты и по образованию прозрачных зон на поверхности соли. Для реакции на азотистую кислоту можно пользоваться раствором йод-цинк-крахмала или реактивом Грисса. Азотная кислота может быть обнаружена бруцином. Нитрифицирующие бактерии развиваются медленно и поэтому азотистую и азотную кислоты можно обнаружить только через 7–10 дней после посева. Колонии нитрифицирующих бактерий очень мелкие, нежные, вокруг них образуются зоны растворения соли. По этим зонам подсчитывают количество колоний нитрифицирующих бактерий. Азотистую и азотную кислоту можно обнаружить значительно раньше, чем видимое появление колоний.

Для выявления нитрифицирующих и аэробных целлюлозоразлагающих бактерий кремнекислый гель можно заменить выщелоченным агаром.

Для выявления **азотобактера** почвенную взвесь разных разведений вносят в пустую стерильную чашку и затем туда же наливают тонким слоем расплавленную и охлажденную до 40 °С агаризованную среду Эшби (примерно 5–7 мл). Если в почве содержится малое количество азотобактера (не выявляемое даже при разведении 1 : 1000), то рекомендуется налить в чашку Петри безазотистую среду и, когда она

застынет, разложить на ее поверхности комочки почвы. При наличии азотобактера вокруг комочков образуются характерные колонии. Надежным методом для обнаружения азотобактера являются почвенные пластинки.

Важную роль в почве играют **денитрифицирующие бактерии**: количественный учет их можно производить на среде Гильта или же на среде Е.Ф. Березовой. В среду можно прибавить 0,1%-ный раствор бромового тимолового синего до появления четкого зеленого окрашивания. Изменение окраски в синий цвет свидетельствует о процессах восстановления. О развитии денитрифицирующих бактерий судят по газообразованию и изменению окраски среды. Газообразование – наиболее важный признак, так как оно показывает полное восстановление нитратов до аммиака и даже газообразного азота, производимое истинными денитрификаторами, а изменение окраски среды без газообразования свидетельствует о процессе восстановления лишь до промежуточных соединений. Наблюдения ведутся на 3–5–7-е сутки. При последнем наблюдении можно качественными реакциями проверить полноту восстановления нитратов в нитриты с дифиниламином и реактивом Грисса. При наличии газообразования обнаружить нитраты и нитриты обычно не удастся, так как там процесс восстановления доведен до освобождения газообразного азота.

Вопросы для самоконтроля

1 Охарактеризуйте почву, как субстрат для развития разнообразных микроорганизмов.

2 Перечислите основные этапы работы по изучению почвенной микрофлоры.

3 Каким образом производится отбор и подготовка почвенных образцов к микробиологическому анализу?

4 Охарактеризуйте основные группы микроорганизмов, выявляемые при высеве из почвы на МПА.

5 Где содержится больше микробов (в расчете на 1 г почвы): в степной черноземной или песчаной почве? В поверхностных или глубоких слоях почвы? Как объяснить эти различия?

6 Почему метод учета микроорганизмов по количеству колоний, выросших на поверхности МПА в чашке Петри, дает заниженные результаты?

7 Можно ли по размеру и макроморфологическим (культуральным) признакам колоний микроорганизмов почвы, культивированных на МПА, судить о принадлежности микроорганизмов к той или иной физиологической группе, тому или иному роду?

Практическое занятие 11/1

Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу и прямой счет микроорганизмов в почве

Цель: ознакомление с основными этапами работы по изучению почвенной микрофлоры; определение численности микроорганизмов в почве прямым подсчетом клеток под микроскопом.

Материалы и оборудование: почва (0,5–1,0 кг), колбы на 250 мл, стекло 50 х 50 см, фарфоровые чашки, пинцет, резиновые перчатки или пестик, весы технические, качалка со 150–250 об/мин, спирт 96 %-ный, предметные стекла, миллиметровая бумага, карболовый раствор эритрозина (либо набор любых красителей), мостики, промывалки с водой, ванночки, фильтровальная бумага, микроскопы, окулярная сетка, объективный микрометр, иммерсионное масло, ножницы, спиртовки, бактериальные петли, бактериологический шпатель, спички, стерильные пипетки на 10; 1–2; 0,1 мл или шприцы на 0,1; 1,0; 10 мл, 100 мл стерильного 0,5%-ного физиологического раствора, стерильная водопроводная вода (2 х 100 мл), стерильные пенициллиновые бутылочки – 10 шт., резиновая груша, чашки Петри с питательной средой (МПА, либо «Сухой питательный агар для культивирования микроорганизмов»), маркер по стеклу.

Ход работы

1 Ознакомиться с методикой отбора почвенных образцов для микробиологических исследований.

2 Составить и зарисовать схему отбора почвенных образцов для микробиологических исследований с поля размером 10 м х 10 м; 50 м х 50 м.

3 Ознакомиться с методикой подготовки почвенного образца к микробиологическому анализу.

4 Подготовить почвенный образец для микробиологического анализа. Получить исходную суспензию исследуемого материала, разведение которого равно $1 : 10^2$.

5 Приготовить десятичные разведения исходной почвенной суспензии в стерильном 0,5%-ном водном растворе NaCl. Получить разведения $1 : 10^3$ – $1 : 10^{10}$.

6 Выполнить посев материала из разведений $1 : 10^6$, $1 : 10^8$, $1 : 10^{10}$ на заранее приготовленную агаризованную питательную среду (например, «Питательный агар для культивирования микроорганизмов»). Объем посевного материала – 0,1 мл (2 капли), его вносят из каждого разведения отдельной пипеткой на поверхность предварительно подсушенной среды. Материал распределяют с помощью стерильного шпателя по поверхности плотной среды. Каждое разведение высевают в двух–трехкратной повторности. Материал культивируют в термостате при температуре 28–30 °С в течение 6–7 суток.

7 Определить количество микроорганизмов в почве по методу Виноградского-Шульгина-Брида (п. 2.3), используя разведения $1 : 10^8$, $1 : 10^9$, $1 : 10^{10}$.

8 Полученные данные записать в рабочую тетрадь по следующей форме (таблица 11.1):

Таблица 11.1 – Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл (1 г) исследуемой почвы

Разведение материала	Количество клеток микроорганизмов, наблюдаемых в разных полях зрения микроскопа										в 1 г почвы
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
$1 : 10^8$											
$1 : 10^9$											
$1 : 10^{10}$											
Вывод:											

9 Пользуясь данными таблицы 11.1 и правилами прямого счета микроорганизмов в почве (п. 2.3), выполнить пересчет количества клеток микроорганизмов в 1 г исследуемой почвы. Результаты занести в таблицу 11.1.

10 Сделать выводы: указать соответствие полученных результатов при каждом разведении.

Практическое занятие 11/2

Выявление и определение численности микроорганизмов почвы высевом на питательную среду, изучение их культуральных особенностей

Цель: выявление и определение численности микроорганизмов почвы высевом на питательную среду, изучение их культуральных особенностей.

Материалы и оборудование: спирт 96 %-ный, предметные стекла, миллиметровая бумага, набор красителей, мостики, промывалки с водой, ванночки, фильтровальная бумага, окулярная сетка, микроскопы биологические, объективный микрометр, иммерсионное масло, ножницы, спиртовки, бактериальные петли, спички, чашки Петри с посевами предыдущего занятия, лупы, линейки.

Ход работы

1 Используя чашки Петри с посевами предыдущего занятия, подсчитать число выросших колоний и определить количество микроорганизмов в 1 г почвы, выявленных на питательном агаре. Колонии, как правило, считают, не открывая чашку Петри. Для удобства отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки, пользуясь чернилами по стеклу. Все результаты подсчета колоний и последующих расчетов записать в таблицу 11.2.

Таблица 11.2 – Численность колоний микроорганизмов и расчет количества микроорганизмов в 1 г почвы

Разведение	Повторность опыта	Количество колоний на чашках	Σx	a (средне-арифметическое)	Количество микроорганизмов в 1 г почвы
$1 : 10^8$	1				
	2				
	3				
$1 : 10^9$	1				
	2				
	3				
$1 : 10^{10}$	1				
	2				
	3				

2 Для определения количества микроорганизмов в 1 г почвы, полученные данные подставляют в формулу:

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

где М – количество клеток микроорганизмов в 1 мл (1 г); а – среднее количество колоний при высеве из данного разведения; V – объем суспензии в мл, взятой для посева (=0,05 мл); 10ⁿ – коэффициент разведения; n – порядковый номер разведения.

3 Описать и зарисовать выросшие колонии микроорганизмов. Результаты наблюдений внести в таблицу 11.3, сгруппировав их по общим признакам. Вычислить соотношение (в %) между разными группами микроорганизмов.

Таблица 11.3 – Культуральные признаки колоний микроорганизмов, выросших на питательной среде

№ колоний	Форма	Диаметр, мм	Блеск, прозрачность	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок колонии
1										
2										
...										
n										
Вывод: (указать %-ное соотношение между разными группами микроорганизмов; отметить разнообразие микрофлоры в анализируемой почве, выявленное на питательной среде)										

4 Выбрать один тип колоний, преобладающий на данной чашке Петри. Приготовить препараты «раздавленная капля» и фиксированный (окраска по Граму, на наличие спор).

5 Препараты микроскопировать с объективами 10х и 100х. Отметить форму и сочетание клеток, подвижность, наличие или отсутствие спор. Сделать зарисовки.

6 Все наблюдения и рисунки указать в таблице 11.4. Под каждым рисунком отметить увеличение микроскопа.

Таблица 11.4 – Некоторые особенности морфологии клеток микроорганизмов

№ колонии (см. табл. 11.3)	
Рисунок (клеток)	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Подвижность	
Окраска по Граму	
Наличие спор	

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф.СКОРИНЫ

Литература

- 1 Борисов, Л. Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
- Выделение и идентификация микроорганизмов; учебно-методическое пособие / Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2003. – 36 с.
- 3 Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2002. – 100 с.
- 4 Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией / С.А. Павлович. – Мн.: Вышэйшая школа. 2008. – 799 с.
- 5 Практикум по микробиологии /А. И. Нетрусов [и др.]. – М.: Академия, 2005. – 604 с.
- 6 Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер [и др.]. – М.: Колос, 1979. – 216 с.