

О. В. Поворова

МИКРО БИОЛОГИЯ



Издательство
«Могилевский государственный университет имени
А. А. Кулешова»
2015

Электронный аналог печатного издания:

О. В. Поворова
Микробиология

Могилев : МГУ имени А. А. Кулешова, 2015. – 88 с. : ил.

ISBN 978-985-568-086-5

Данный практикум затрагивает вопросы общей микробиологии, экологии микроорганизмов, их многообразия, что позволит систематизировать уже полученные знания по биологическим предметам, а также быть подготовленным к будущим экологическим дисциплинам. Практикум включает 8 лабораторных, 3 семинарских занятия, задания для самостоятельного контроля знаний. Каждая лабораторная работа представляет собой небольшое научное исследование. Предлагаемая форма изложения позволяет самостоятельно воспроизводить и наблюдать в лабораторных условиях микробиологические процессы, идущие в природе.

Для студентов биологических специальностей. Предлагаемое практическое руководство может быть полезно учителям биологии и экологии в подготовке к занятиям, олимпиадам, проведению исследовательских работ.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

Поворова, О. В. Микробиология [Электронный ресурс] : практикум / О. В. Поворова. – Электрон. данные. – Могилев : МГУ имени А. А. Кулешова, 2015. – Загл. с экрана.

212022, г. Могилев
ул. Космонавтов, 1
тел.: 8-0222-28-31-51
e-mail: alexpzn@mail.ru
<http://www.msu.mogilev.by>

© Поворова О. В., 2015
© МГУ имени А. А. Кулешова, 2015
© МГУ имени А. А. Кулешова,
электронный аналог, 2015

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

СВЕТОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ

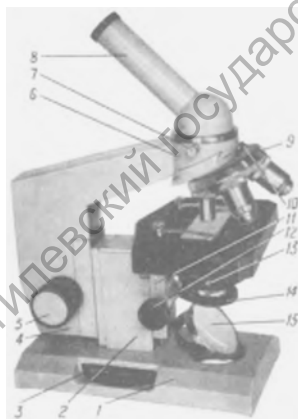
Цель: Освоить правила пользования микроскопом в микробиологической практике и основные методы окрашивания.

Задачи:

1. Освоить технику микроскопии в иммерсионной системе.
2. Освоить методы микроскопических исследований
3. Освоить технику простых и сложных методов окрашивания.

Методические указания

1. Метод светлого поля в проходящем свете применяется при исследовании прозрачных препаратов, у которых различные участки структуры по-разному поглощают свет. Пучок лучей из осветительной системы проходит препарат и объектив и дает равномерно освещенное поле в плоскости изображения. Элементы структуры препарата частично поглощают и отклоняют падающий на них свет, что и обуславливает появление изображения. Освещение препарата производится сверху, через объектив, который одновременно выполняет роль осветительной системы. Изображение, как и при проходящем свете, создается за счет того, что разные участки препарата неодинаково отклоняют падающий на них свет, а отраженные лучи имеют различную интенсивность.



1. Основание (башмак)
2. Коробка с механизмом точной настройки
3. Микровинт точной настройки
4. Тубусодержатель
5. Макровинт грубой настройки
6. Головка тубусодержателя с направляющей типа «ласточкин хвост» для револьвера и гнездом для моноуклеарной насадки
7. Винт для закрепления моноуклеарной насадки
8. Моноуклеарная насадка (с окуляром)
9. Револьвер с четырьмя объективами
10. Винт для фиксации револьвера относительно тубусодержателя
11. Кронштейн конденсора
12. Рукоятка для перемещения кронштейна конденсора
13. Винт для закрепления конденсора в гильзе кронштейна
14. Линза откидная в оправе
15. Зеркало

Рис. 1. Строение микроскопа

Основной технической характеристикой микроскопа является разрешающая способность – минимальное расстояние между двумя точками рассматриваемого предмета, на котором они не сливаются в одну и предмет виден отчетливо. На «Биоламе» предельная разрешающая способность равна 0,21 мкм, поэтому можно рассматривать объекты не менее 0,21 мкм (объект увеличивается до 1800 раз).

Объективы малого (3х, 5х, 8х, 9х) и среднего увеличения (20х, 40х, 60х) применяют для предварительного осмотра и изучения крупных клеток микроорганизмов (грибов). Они называются объективами сухой системы, т.к. при микроскопии между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. Объективы являются наиболее ценной частью микроскопа. Они ввинчиваются в гнезда револьвера и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя, или фронтальная, линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения и называются коррекционными.

Объективы больших увеличений (85х, 90х, 100х) называются иммерсионными и их применяют для изучения мелких форм микроорганизмов (бактерий). В работе с этими системами препарат должен быть максимально освещен. Светорассеивание устраняется благодаря использованию иммерсионных жидкостей, показатель которых близок к показателю преломления стекла. Из-за различия показателей преломления воздуха ($n = 1$) и стекла ($n = 1,52$) часть света, освещающих препарат, рассеивается и не попадает в объектив. Иммерсионными называются объективы, фронтальная линза которых при работе погружается в нанесенную на препарат каплю жидкости с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Лучшим для этой цели является кедровое масло с коэффициентом преломления 1,515 (коэффициент преломления стекла – 1,53). Световые лучи при переходе из стекла в слой кедрового масла не преломляются и, не отражаясь, попадают в объектив. Таким образом, достигается наилучшее освещение рассматриваемого предмета.

Окуляр находится в верхнем конце тубуса. Окуляр представляет собой систему двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклостью в сторону объектива. Линза, обращенная к глазу, называется глазной, а обращенная к препарату – собирающей. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая кривые лучи света. Окуляры помечаются цифрами, показывающими их собственное увеличение: 5, 7, 10, 15.

Наиболее четкое изображение предмета получается при сочетании сильных объективов со слабыми и средними окулярами. Для того чтобы определить увеличение данной системы микроскопов, следует умножить показатель увеличения объектива на показатель увеличения окуляра. Например, при окуляре на 7 и объективе на 90 увеличение микроскопа равно 630.

Техника микроскопии в иммерсионной системе

1. Установить микроскоп на рабочем месте так, чтобы он был неподвижен (положите под башмак микроскопа лист бумаги или салфетку).

2. Включите настольную лампу и направьте свет на вогнутую поверхность зеркала.

(Зеркало отражает световые лучи и направляет их к конденсору. Конденсор представляет собой систему сильных линз и служит для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Собирая лучи света, отраженные зеркалом, конденсор концентрирует их в плоскости препарата. Передвигается конденсор в вертикальном направлении при помощи винта. При опускании конденсора – поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии – освещается. При слишком сильном освещении для зрения конденсор рекомендуется опустить, а при слабом – поднять. Под конденсором находится ирис-диафрагма, состоящую из тонких металлических сегментов, сдвигаемых или раздвигаемых при помощи рычажка сбоку для регулирования поступления света в конденсор.)

3. Глядя в окуляр (объектив на 8) отрегулировать свет зеркалом так, чтобы освещение было максимальным.

4. Установить на рабочий столик предметное стекло, закрепить его двумя клеммами. Установить предметное стекло так, чтобы окрашенный мазок находился над собранным конденсором пучком света.

5. Нанести каплю иммерсионного масла на окрашенный мазок (Открывать крышку флакона выкручивающим движением, а не вытягивать стеклянную палочку).

6. Поднять тубус макровинтом (большой винт по бокам тубусодержателя), установить объектив на 90, вращая револьвер по (!) часовой стрелке до щелчка.

7. Глядя сбоку опускать тубус макровинтом так, чтобы капля масла «раздавилась», при этом линза объектива вошла в каплю масла, но не дотронулась до стекла (чтобы не раздавить препарат и фронтальную линзу иммерсионного объектива).

8. Глядя в окуляр слегка приподнять тубус макровинтом до появления изображения.

9. Установить четкость изображения микровинтом (находится горизонтально в башмаке микроскопа).

10. Найти лучшее поле видения, вращая ручки, находящиеся по бокам рабочего столика (нельзя под иммерсионным объективом перемещать стекло вручную, как вы это делали под малым объективом на зоологии).

11. Зарисовать в тетрадь предмет исследования.

12. Поднять тубус макровинтом.

13. Убрать предметное стекло с рабочего столика. Снять фильтровальной бумагой остаток масла со стекла, вымыть стекло.

14. Установить объектив на 8, вращая револьвер по часовой стрелке.

15. В конце работы чистой сухой салфеткой вытереть остаток масла на линзе иммерсионного объектива, затем протереть другой салфеткой со смесью Никифорова (Нельзя оставлять масло на поверхности линзы, так как на нем собирается пыль, что может привести к повреждению объектива.). Конденсор опустить. На рабочий столик уложить чистую салфетку и опустить максимально вниз объектив на 8 (вращением макровинта вниз опускается тубус), прижимая салфетку. Зеркало установить горизонтально. Сдать микроскоп дежурному.

2. Методы микроскопического исследования.

Нативные препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространенными являются методы «вишней капли», «раздавленной капли», микрокамеры с плотными средами.

Фиксированные препараты. Цель фиксации – закрепить препарат на стекле, чтобы при окраске он не смывался, убить микроорганизмы для безопасности последующего исследования. Кроме того, мертвые клетки красятся лучше, чем живые, т.к. проницаемость их клеточной стенки увеличивается, поэтому необходимо повысить восприимчивость клеток к красителям. Способность клеток воспринимать различные красители отражает их тинкториальные свойства, что определяется структурой и составом клетки.

Выделяют физические и химические методы фиксации. Чаще всего осуществляется физический метод – нагревание (термический метод или фламбирование), т. е. над пламенем горелки. Хотя данный метод фиксации и является достаточно грубым, но сохраняет морфологию и отношение бактерий к красителям. Препарат проносят 2–4 раза над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони вызывало легкое жжение). Для более детального изучения структуры клеток используют фиксирующие

растворы, превращающие ферментативный автолиз бактерий и стабилизирующие макромолекулы путем химического их сшивания. Наиболее часто применяют формалин, спирты, жидкость Карнуа, ацетон и др. Мазки фиксируют, помещая в раствор фиксатора или нанося на мазок.

Для изучения строения бактериальной клетки фиксацию проводят химическими веществами, время воздействия которых различно. Этиловым спиртом (96%) – в течение 10–15 мин., метиловым или амиловым спиртом – 3–5 мин., жидкостью Никифорова (смесь этилового спирта и эфира поровну) – 10–15 мин., ацетоном – 5 мин., хлороформом – несколько секунд, жидкостью Карнуа (96%-ного спирта – 60 мл, хлороформа – 30 мл, ледяной уксусной кислоты – 10 мл) – в течение 10 мин.

Окрашивание препаратов проводится с помощью красителей, которые можно разделить на:

- позитивные (метиленовый синий, фуксин) и негативные (нигрозин). Позитивными называются красители, окрашивающие микроорганизмы и другие находящиеся на стекле фиксированные объекты. Негативными – красители, заполняющие пространство, окружающее микроорганизмы, в результате чего последние становятся видимыми в виде силуэтов на фоне красителя;

- кислые (эозин, конго красный) и щелочные (гематоксилин, толуидиновый синий, азур). Кислые красители связываются с веществами, имеющими щелочную реакцию (например, цитоплазматическими елками). Щелочные – связываются с базофильными (кислыми) компонентами клеток (нуклеиновыми кислотами, рибосомами).

Основные цвета окрашивания могут быть следующими:

- красный (основной фуксин, кислый фуксин, сафранин, конго красный);
- фиолетовый (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый);
- синий (метиленовый синий, толуидиновый синий, водный синий);
- зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

При наблюдении под микроскопом можно заметить активное движение бактерий, которые перемещаются в разных направлениях с разной скоростью. Не следует смешивать самостоятельное движение бактерий с броуновским движением взвешенных в воде мельчайших частиц. Броуновское движение характеризуется беспорядочным колебанием бактерий на одном месте с отклонением то в одну, то в другую сторону. Движение бактерий не следует также смешивать с чисто механическим перемещением, когда с током жидкости все частицы передвигаются в одном направлении с одинаковой скоростью.

Для изучения внутреннего строения клеток применяют специальные способы окраски – **цитохимические** методы исследования. При окрашивании мазка краситель проникает в клетку. Сложные методы окраски основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Сущность метода – на мазок воздействуют несколькими красящими веществами, одно из которых называется основным (главным), другие – дополнительными (контрастными). После действия первого раствора красителя мазок в зависимости от способа окраски обесцвечивают спиртом, кислотой, щелочью, ацетоном и др. К обесцвечивающим веществам микробы относятся по-разному. Одни из них являются кислото- и спиртоустойчивыми, другие – только кислотоустойчивые, третьи – не устойчивые к этим веществам. Для определения отношения микроорганизма к окраске по Граму следует использовать молодые, лучше суточные культуры, так как микроорганизмы из старой или погибающей культуры неодинаково интенсивно красятся по Граму. Мазки, нанесенные на стекло, должны быть по возможности тонкими и ровными. При толстом мазке дифференциация его будет затруднена и граммотрицательные формы бактерий могут выглядеть грамположительными.

Окраска бактерий по Граму Окрашивание зависит от химического состава клеточной стенки, цитоплазмы и pH среды. У грамположительных микробов содержится РНК примерно в 8 раз больше, чем ДНК, до 50% (по массе) тейхоевых кислот, цитоплазма имеет кислую реакцию (pH 2–3). 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.

Принцип окраски. У первой группы микроорганизмов при окрашивании растворами красителей трифинилметанового ряда (генцианвиолет, кристаллвиолет) в присутствии йода образуется прочное соединение, не разрушающееся при последующем обесцвечивании спиртом. При этом микробные клетки остаются окрашенными в темно-синий цвет. **Грамположительные бактерии** (положительно красящиеся по Граму) **окрашиваются в фиолетовый цвет**. В стенке грамположительных много (до 80% от сухой массы клеток) пептидогликана, поры которого при обработке этиловым спиртом сужаются и препятствуют выходу комплекса, образуемого при взаимодействии красителя генцианового фиолетового с компонентами клетки в присутствии йода. В поверхностном слое грамположительных микробов находится магниевая соль рибонуклеиновой кислоты, которая в присутствии йода в кислой среде образует прочное соединение с основными красителями – генциановым фиолетовым или др.

Поэтому грамположительные прочно удерживают краситель и окрашены в фиолетовый цвет. После удаления рибонуклеата магния из грамположительных клеток они становятся грамтрицательными. Микробы второй группы при воздействии спиртом обесцвечиваются и воспринимают дополнительную окраску, т.е. не красятся по Граму. **Грамотрицательные бактерии** (отрицательно красящиеся) **окрашиваются в розовый цвет** (цвет дополнительной окраски – в данном случае фуксина). У грамтрицательных в состав многослойной клеточной стенки входят ароматические, серосодержащие и др. аминокислоты, цитоплазма имеет кислую реакцию (рН 5) и примерно одинаковое количество ДНК и РНК. У грамтрицательных бактерий не образуется прочного соединения основных красителей, они легко обесцвечиваются этиловым спиртом, и краситель смывается. Эти клетки дополнительно окрашивают другим красителем – фуксином Пфейффера. В культуре грамположительных могут быть и грамтрицательные особи – это микробные «трупы», которые претерпели внутриклеточный аутолиз, в результате чего клетки лишились рибонуклеата магния. Также окрашиваются и клетки с поврежденной оболочкой.

Лабораторный практикум

Работа 1. МИКРОСКОПИРОВАНИЕ МЕТОДОМ РАЗДАВЛЕННОЙ КАПЛИ

Для изучения микроорганизмов в живом состоянии (нативный препарат).

1.1. Исследование бактерий, выращенных в жидкой среде.

1. Предметное стекло обезжирить (кусочком хозяйственного мыла натереть в центральной части предметного стекла и насухо вытереть чистой салфеткой). Предметное стекло уложить на стеклянный мостик над стеклянной кюветой.

2. Микробиологическую петлю простерилизовать над горящей спиртовкой.

3. Взять каплю бульонной культуры стерильной бакпетлей и нанести на предметное стекло, при этом капля должна быть небольшой, чтобы после раздавливания жидкость не выступала за края покровного стекла

4. Накрыть («раздавить») покровным стеклом. Покровное стекло ставят на ребро у края водной капли и постепенно опускают на нее. При осторожном опускании покровного стекла между стеклами не остается пузырьков воздуха. Если пузырьки воздуха видны, то легким постукиванием бактериальной иглы выдавить их из под покровного стекла.

5. Установить на рабочий столик препарат, зафиксировать лапками предметное стекло.

6. Каплю иммерсионного масла нанести сверху на покровное стекло и микроскопировать с объективом на 90.

7. Зарисовать микроорганизмы, видимые в поле зрения, оформить отчет.

1.2. Исследование бактерий, выращенных на плотной среде.

1. На чистое обезжиренное предметное стекло (на середину) нанести каплю воды.

2. Стерильной бактериологической иглой, прокаленной в пламени спиртовки и охлажденной, взять небольшую массу бактерий из чашки Петри (аккуратно, чтобы не захватить питательную среду), размешать в капле воды на предметном стекле.

3. Накрыть («раздавить») покровным стеклом, нанести сверху каплю иммерсионного масла, микроскопировать с объективом на 90.

4. Зарисовать микроорганизмы видимые в поле зрения, оформить отчет.

Работа 2. МИКРОСКОПИРОВАНИЕ МЕТОДОМ ПРИЖИЗНЕННОЙ ОКРАСКИ МИКРОБОВ

Этот метод является видоизменением метода раздавленной капли для лучшей видимости микробов. При этом бактерии сохраняют жизнеспособность, приобретают окраску и отчетливо видны в поле зрения микроскопа.

1. На обезжиренное предметное стекло (на середину) нанести каплю воды.

2. Стерильной бактериологической петлей внести в каплю воды небольшое количество исследуемой культуры, размешать.

3. Накрыть покровным стеклом.

4. Сбоку ребра покровного стекла капнуть на предметное стекло небольшое количество красителя (можно добавить дистиллированной воды, чтобы быстрее краситель ввелся под покровное стекло). Например, если каплю метиленовой сини, сильно разведенную дистиллированной водой, ввести в жидкость под покровное стекло, бактерии окрасятся в голубой цвет.

5. Препарат микроскопировать с использованием иммерсионной системы (увеличение $\times 90$).

6. Зарисовать микроорганизмы видимые в поле зрения, оформить отчет.

Работа 3. МЕТОД ФИКСАЦИИ И ОКРАСКИ ПРЕПАРАТА.

Микробные тела при простом методе окраски окрашиваются в цвет применяемой краски.

1. Обезжирить стекло кусочком хозяйственного мыла.
2. В центр предметного стекла капнуть каплю воды и внести бакпетлей культуру с плотной среды из чашки Петри (если жидкая культура из пробирки, то сразу наносить на стекло без разведения), рассуспензировать, размазать тонким слоем по поверхности стекла на площади 2–3 см² (следить, чтобы мазок не был слишком плотным, был тонким).
3. Досуха высушить мазок на воздухе (1–2 мин).
4. Фиксация мазка сухим жаром. Предметное стекло (можно взять пинцетом) мазком вверх провести сквозь пламя спиртовки плавными круговыми движениями 3–5 раз. При этом микроорганизмы гибнут и прочно прикрепляются к поверхности стекла.
5. Стекло предметное положить на стеклянный мостик над кюветой и оставить на 1–2 мин. для того, чтобы стекло остыло.
6. Нанести на мазок каплю красителя пипеткой, оставить его на 1–2 мин. и следить, чтобы мазок не подсыхал.
7. Смыть избыток краски слабой струей воды из промывалки. Промывание заканчивают, когда промывная вода станет неокрашенной.
8. Снять избыток воды фильтровальной бумагой (прикладывать ее к мазку).
9. Просушить мазок на воздухе под горячей лампочкой настольной лампы. Препарат должен быть совершенно сухим, в противном случае соединение влаги с иммерсионным маслом при микроскопии мазка образует эмульсию (такой же эффект как вы наносите крем на влажные руки) и изображение будет нечетким.
10. Нанести на окрашенный сухой мазок каплю иммерсионного масла и микроскопировать с иммерсионной системой.

Работа 4. СЛОЖНЫЙ МЕТОД ОКРАШИВАНИЯ ПО ГРАМУ

1. Обезжирить стекло.
2. Нанести бакпетлей микроорганизмы из жидкой среды сразу на предметное стекло, из твердой среды – в каплю воды и рассуспензировать. Размазать мазок насколько возможно тоньше.
3. Фиксировать мазок над пламенем спиртовки.
4. Положить предметное стекло на стеклянный мостик, подождать 1–2 мин. чтобы остыло стекло.

5. Сверху на мазок уложить маленький квадрат из фильтровальной бумаги и на него нанести раствор **генцианового фиолетового на 2 мин.**

6. Сбросить бакиглой фильтровальную бумагу в эксикатор. Раствор красителя слить, (не промывая препарат водой).

7. Нанести на мазок 2–3 капли **р-ра Люголя на 2 мин.**

8. Слить раствор Люголя.

9. Нанести на мазок **этиловый спирт до 30 сек.** Окрашенный мазок обесцвечивают 96°– этиловым спиртом (препарат непрерывно покачивают 15–20 сек. до прекращения отхождения фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 30 сек. – в зависимости от толщины мазка – пока мазок не станет серостального цвета. Очень важно четко придерживаться времени обесцвечивания, так как при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки. Следует учесть, что ацетон действует почти мгновенно, 95%-ный этанол обладает более медленным действием. Дифференциацию мазка прекращают, когда закончится вымывание красителя из препарата.

10. Препарат промыть водой из промывалки, уложить на стеклянный мостик.

11. На мазок нанести водный раствор **фуксина Пфейффера на 2 мин.**

12. Краситель слить, препарат промыть **водой**, высушить широкой плоской фильтровальной бумаги, досушить под горячей настольной лампой 1–2 мин. и микроскопировать с иммерсионной системой. После этой обработки грамположительные микроорганизмы приобретают темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные окрашиваются лишь в цвет дополнительной окраски (фуксина). Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры: в старых культурах мертвые клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Поэтому лучше использовать молодые односуточные культуры. Некоторые бактерии окрашиваются *грамвариабельно*, т. е. часть клеток – как грамположительные, а часть – как грамотрицательные.

Работа 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ С ПОМОЩЬЮ КОН

1. На предметное стекло нанести каплю 3% водного раствора КОН.

2. Петлей внести культуру исследуемых бактерий и тщательно перемешать.

3. Если суспензия тянется за петлей в виде тонких слизистых нитей – это грамотрицательные бактерии, если нет (**ОТРЫВАЕТСЯ НИТЬ**) – грамположительные.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель: ознакомиться с формами микроорганизмов и ознакомиться с компонентами бактериальной клетки, методиками их окраски.

Задачи:

1. Предложенные культуры (выбрать три культуры, на одном предметном стекле делать одновременно три мазка из трех различных культур) окрасить сложным методом по Граму и негативным методом окрашивания (каждую культуру двумя методами). Зарисовать, определить отношение бактерий по Граму (т.е. это Гр+ или Гр- бактерии), определить форму бактерий.

2. Теоретически изучить различные методы окрашивания компонентов бактериальной клетки. Практически отработать методики окрашивания и выявления основных компонентов клетки прокариотов. Для окраски одного компонента клетки брать одно предметное стекло и на нем делать три мазка из выбранных ранее культур.

3. Оформить отчет в виде таблицы. Сделать вывод о проделанной работе. Форма отчета полученных результатов исследования:

Объект исследования	Окрашивание по Граму		Компоненты клетки							
	форма	Гр+/Гр-	нуклеонид	капсула	споры	жгутик	гликоген	гранулеза	жир	волютин
1. Зубной налет										
монококки										
диплококки										
тетракокки										
сарцины										
стафилококки										
стрептококки										
палочки										
нитевидные										
вибрионы										
спириллы										
спирохеты										
дрожжи										
2. Культура сена (элективная среда для культивирования сенной палочки)*										
3. Эпифитная микрофлора зерна*										

Примечание: * – те же объекты исследования как при изучении микрофлоры зубного налета.

4. Зарисовать в тетради строение прокариотической клетки.

Методические указания

1. Морфология бактерий. Все микроорганизмы в зависимости от структуры ядра и органелл делят на *прокариоты* и *эвкариоты*. У прокариотов ядерное вещество (генофор) и органеллы не отделены от цитоплазмы специальными оболочками. У эвкариотов ядра и органеллы (митохондрии и хлоропласты) отделены от цитоплазмы мембранами. В настоящее время выявлена третья группа микроорганизмов – *архебактерии*, которые занимают промежуточное положение и отличаются от прокариотов и эвкариотов по цитологическим, физиологическим, биохимическим и другим свойствам. Среди них не обнаружено патогенных форм. Под общим понятием «бактерии» описано свыше 1600 видов микроорганизмов – прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. Большинство представителей бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся размерами и физиологическими свойствами. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные (или кокки), палочковидные, извитые и нитчатые. Из почвы выделены также бактерии, имеющие довольно своеобразную форму.

1.1. Шаровидные (кокковые) формы микробов. Шаровидные формы микробов представляют клетки прокариотического типа, образующиеся в результате деления кокков в одной, двух и трех взаимно перпендикулярных плоскостях кокки (от греч. *kokkos* – зерно, шарик). Они делятся на следующие группы.

1. Микрочкокки (от лат. *micro* – маленький), образуются делением кокков в разных плоскостях и располагаются беспорядочно. Примером могут служить клетки *Micrococcus agilis* (от лат. *agilis* – подвижный). В природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток.

2. Диплококки – кокки, расположенные попарно. *Diploos* – греческое слово, означает двойной. Они образуются при делении кокков в одной плоскости. К ним относится *Azotobacter chroococcum*. Родовое название этих бактерий отражает их способность фиксировать азот атмосферы, видовое – продуцировать коричневый пигмент (от лат. *chroo* – коричневеющий).

3. Стафилококки также располагаются беспорядочно, но при этом скопления кокков чаще напоминают гроздь винограда. *Staphyle* (греческое) – виноградная гроздь.

4. Стрептококки образуются также делением кокков в одной плоскости, но при этом клетки располагаются цепочкой. *Streptos* (греч.) – цепь, витой, плетёный. К роду стрептококков относятся в основном патогенные бактерии. Но стрептококковую форму имеют многие молочнокислые бактерии рода лактококкус *Lactococcus lactis*. Родовое и видовое названия

этих бактерий, образующих короткие цепочки, отражают их причастность к молочнокислому брожению (от лат. *lactis* – молочный).

5. Тетракокки – кокки, расположенные по четыре клетки. *Tetra* (греч.) – четыре. Такое расположение клеток – результат деления материнских форм в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

6. Сарцины по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются вследствие деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. *Sarcio* (лат.) – связывать шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток. Располагаются в виде куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Некоторые виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, в которых с каждой стороны находится уже не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины. *Sarcina flava* (сарцина желтая) – наиболее распространенный представитель микрофлоры воздуха.

Все шаровидные формы бактерий, за исключением *Lactococcus lactis*, просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

1.2. Палочковидные формы микробов. Палочковидные или цилиндрические микробы имеют разную форму, длину и толщину. Форма их может быть овальная, цилиндрическая, веретенообразная. Концы закруглены или как бы обрублены. Палочковидные формы делят на две группы: образующие споры (**бациллы**) и не обладающие такой способностью (**бактерии**). Бациллы могут иметь форму лимона, ракетки, барабанной палочки и т. д. Как и шаровидные, палочковидные формы располагаются поодиночке, скоплениями, попарно – диплобактерии и диплобациллы, цепочкой – стрептобактерии и стрептобациллы. Длина некоторых микробов незначительно превышает толщину, по форме они приближаются к коккам, в связи с чем их называют коккобактериями.

Палочковидные бактерии, к ним относят формы, образующие споры (роды *Bacillus*, *Clostridium* и др.) и не образующие их (роды *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* и др.). С представителями палочковидных бактерий, **образующих споры**, можно познакомиться на примере *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus*. В названии первого вида отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложно-грибовидного налета (от лат. *mycoides* – грибовидный), напоминающего мицелий грибов. Поскольку *Bacillus mycoides* – спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, прокрашивается красителем, а спорогенная зона – нет. Поэтому под микроскопом бацилла выглядит неравномерно окрашенной. Спорогенная зона, как более плотная и непрокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки

Bacillus mycoides относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать двух-трехсуточную культуру (в более позднем возрасте клетки переходят в стадию спорообразования). *Bacillus mesentericus* (картофельная палочка) также относится к стрептобациллам. Для того, чтобы накультивировать картофельную палочку возьмите клубень картофеля, вымойте, высушите салфеткой. Вдоль клубня сделайте продольный срез толщиной 1–1,5 см, положите в чашку Петри, натрите с обеих сторон порошком мела, сбрызните водой, закройте крышкой и поставьте в тепло (под батарею, в термостат) на несколько дней.

Палочковидные бактерии просматривают на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Нитчатые формы. Представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто окруженные общим *влагалищем*, или *чехлом*. Нитчатые бактерии распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах эти бактерии часто образуют охристые осадки.

Для знакомства с нитчатыми бактериями рекомендуется брать пробу воды с охристыми отложениями из естественных водоемов. Препарат готовят в раздавленной капле и просматривают с иммерсионной системой. Наиболее часто на нем встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа откладывается во влагалищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. Размножается *Leptothrix* делением концевой (молодой) клетки, обращенной внутрь влагалища. При этом старые клетки оттесняются (выталкиваются) молодыми; нить и влагалище в результате размножения и роста клеток удлиняются. Нередко старые клетки отчленяются от общей нити. На препарате часто обнаруживаются остатки ожелезненных чехлов (в виде тонких трубок) и другие ожелезненные структуры. Для выявления вегетативных клеток железобактерий пробу берут непосредственно из охристых осадков, препарат фиксируют 96%-ным спиртом, обрабатывают 1%-ным раствором HCl (для обесцвечивания влагалищ) и окрашивают в течение суток эритрозинном. Влагалища клеток на таком препарате бесцветны, а вегетативные клетки и гонидии красные. *Гонидии* – образования овальной или округлой формы, в некоторых случаях имеющие жгутики. Гонидии формируются у тех нитчатых бактерий, которым свойственна дифференциация нити.

1.3. Извитые формы. В зависимости от степени поворота тела клетки вокруг своей оси, различают следующие извитые формы микроорганизмов.

1. Вибрионы имеют форму запятой, *vibrare* (лат.) – извиваться, дрожать. Это слегка изогнутые клетки: изгиб их меньше половины окружно-

сти. Поворот тела вокруг оси не превышает четверти оборота. На конце расположен один жгутик.

2. Спириллы (лат. *spiro* – штопор). В отличие от вибрионов их клетки более длинные, толстые и извитые: извитость или равна, или больше половины окружности. Спириллы могут иметь один завиток в виде русской буквы С, два завитка в виде латинской буквы S или несколько – в виде спирали. Характеризуются небольшим числом крупных завитков (не более пяти). Передвигаются с помощью жгутиков.

3. Спирохеты – длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков; длина клеток превышает их толщину в 5–200 раз. Имеют штопорообразную форму и большое количество мелких завитков. Способны сокращаться. На конце тела спирохет обнаружены жгутики, расположенные пучком. Благодаря такому строению спирохеты осуществляют сгибательное, вращательное и поступательное движения.

Вибрионы и спириллы удобно просматривать на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из навозной жижи, предварительно инкубированной в течение нескольких суток в термостате. На таком препарате много клеток разных видов микроорганизмов, среди них часто встречаются извитые формы.

Для ознакомления со спирохетами следует приготовить фиксированный крашенный препарат зубного налета. Особенно удачны препараты скоба из кариесного (гнилого) зуба. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные, короткие (всего 2–3 завитка).

2. Строение бактериальной клетки.

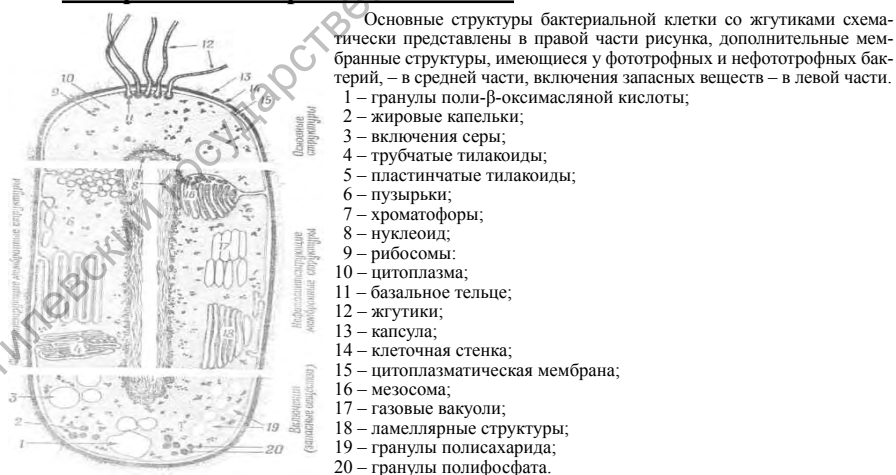


Рис. 2. Схематическое изображение бактериальной клетки

2.1. Подвижность бактерий. Поступательное движение бактерий за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя в большинстве случаев светлопольный микроскоп. Наиболее эффективно наблюдение за подвижностью в темнопольном микроскопе. Чтобы убедиться, что жгутики действительно присущи данным микроорганизмам, а также определить их расположение (полярное, перитрихальное, латеральное), требуются методы с применением окрашивания. Для окрашивания жгутиков предложено несколько методов, общим этапом для которых является протравливание препарата (обычно растворами таннина, 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.

Подвижность бактерий может быть выявлена с использованием **техники посева в столбик агара**. При этом культуру бактерий засевают уколом в столбик 0,3% питательной среды в пробирке. Пробирки помещают в термостат для инкубирования. Результаты учитывают через 24–48 часов. Подвижные бактерии растут по всей толще агара, вызывая диффузное помутнение среды, неподвижные – только по линии укола.

Жгутики микроорганизмов – тончайшие образования (0,02–0,04 мкм), легко отрывающиеся от клетки при обработке. Это затрудняет их исследование. В основе методов окрашивания жгутиков лежит обработка их протравителями, в результате которой они увеличиваются в объеме.

Для подготовки культуры рекомендуется ежедневно несколько дней подряд делать пересевы на свежую питательную среду (в жидкую среду или в конденсационную воду свежей скошенной агаризованной среды). В день просмотра материал берут петлей и переносят в пробирку с 5–6 мл стерильной водопроводной воды, нагретой до 37°C. Не рекомендуется размешивать бактериальную массу в воде петлей, она сама должна разойтись в ней в течение 30–60 мин.

Прежде чем приступить к работе, необходимо проверить подвижность клеток в висячей капле. В случае отсутствия подвижности пробирку оставляют в термостате на 1½–2 сут.

Для приготовления препаратов необходимы *абсолютно чистые* предметные стекла. Их кипятят в растворе бихромата калия в крепкой серной кислоте, затем дважды промывают в растворе едкого натра. После этого стекла промывают водой и хранят в банке с 96%-ным спиртом. Затем ту сторону стекла, на которую будет нанесен мазок, сильно нагревают и охлаждают.

Метод Леффлера. Суспензию 12–16-часовой культуры бактерий наносят на предметное стекло и сушат при комнатной температуре. Допустимо зафиксировать мазок, быстро проведя его через пламя. Далее препарат обрабатывают протравителем 3–5 мин, нагревая его до появления паров или в течение 15–20 мин при комнатной температуре, затем промывают сильной струей дистиллированной воды 30 с и высушивают на воздухе.

Окрашивают препарат 3–4 мин карболовым фуксином Циля или раствором, содержащим 1 часть насыщенного спиртового раствора фуксина и 10 частей воды при легком нагревании до появления пара. Затем препарат промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом с иммерсией. Жгутики и клетки бактерий окрашиваются в розовый цвет.

Приготовление **протравителя.** 12 г таннина растворяют при нагревании в 48 мл воды, добавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса (FeSO_4) и 6 мл насыщенного раствора фуксина в 96%-ном спирте. Смесь готовят за несколько дней до употребления, хранят в склянке с притертой пробкой в темном месте. Перед началом работы ее фильтруют.

Метод Лейфсона. Стеклографом на одной половине стекла по границе вычерчивают прямоугольник. На площадь прямоугольника петлей наносят суспензию бактерий. Наклоняя стекло, дают возможность стечь избытку жидкости на противоположную сторону стекла. Препарат сушат при комнатной температуре на воздухе.

На мазок наносят точно 1 мл парарозанилинового красителя, следя за тем, чтобы он не растекался за нанесенные на стекло линии. Поскольку в красителе содержится танниновая кислота, предварительной фиксации не требуется. Окрашивание длится 7–15 мин (время определяют в каждом конкретном случае экспериментально). Для уточнения правильности срока окраски препарат помещают на черный фон и освещают сбоку. Как только по всему мазку выпадет осадок, избыточный краситель удаляют слабой струей дистиллированной воды, не отмывая выпавший в осадок краситель. Если клетки бактерий не окрасились в красный цвет, их докрасивают метиленовым синим.

Приготовление *парарозанилина.* Для этого необходимы три раствора: *первый* – 1,5%-ный NaCl в дистиллированной воде, *второй* – 3%-ный танниновой кислоты в дистиллированной воде (раствор должен быть светло-желтым); *третий* – 0,9%-ный парарозанилинацетата, или 0,3%-ный парарозанилингид-рохлорида в 96%-ном этиловом спирте. Для получения однородной смеси требуется несколько часов даже при взбалтывании. Вместо соли розанилина можно применить основной фуксин в виде 1,2%-ного раствора в 96%-ном этиловом спирте.

Для приготовления красителя смешивают равные объемы всех трех растворов, полученную смесь хранят в плотно закупоренной склянке. Краситель сохраняет свои свойства при 4°C несколько недель, а при $t = -10-20^{\circ}\text{C}$ – месяцы и даже годы.

Метод серебрения жгутиков по Морозову. Готовят три реактива. Состав *первого*: 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл формалина, 100 мл дистиллированной воды; состав *второго*: 5 г таннина, 1 мл жидкой карболовой кислоты (фенола), 100 мл дистиллированной воды; состав *третьего*: 5 г кристаллического нитрата серебра (AgNO_3), 100 мл дистиллированной воды.

К 80 мл раствора серебра по каплям приливают водный раствор аммиака (нашатырного спирта) до растворения образовавшегося осадка и появления легкой опалесценции. Если аммиака будет добавлено слишком много, то из оставшихся 20 мл раствора серебра следует добавить еще несколько капель до возникновения опалесценции.

Для окраски препарата полученный раствор серебра разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 100.

Техника окраски следующая: на 1 мин. на препарат наливают первый реактив, сливают его, промывают препарат водой; наливают второй реактив, препарат подогревают на слабом пламени 1 мин до появления паров, тщательно промывают водой; 1–2 мин при нагревании обрабатывают препарат третьим реактивом до появления темно-коричневой окраски, тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Геном бактерий. Оформленное ядро встречается только у высокоорганизованных микроорганизмов: дрожжей, грибов и миксобактерий. В цитоплазме остальных микроорганизмов обнаруживаются прерывистые структуры, содержащие ДНК и белок, называемые нуклеоидом или бактериальной хромосомой. Поэтому типичного и оформленного ядра, отграниченного от цитоплазмы ядерной мембраной, у большинства прокариот нет.

Нуклеоид является носителем наследственных свойств клетки и фактором передачи этих свойств будущему потомству. «Ядро» бактерий отождествляется с хромосомой, которая представлена длинной нитью ДНК, перекрученной и замкнутой в кольцо. В цитоплазме бактериальных клеток содержится много РНК, которая окрашивается ядерными красками так же, как и ДНК ядра, поэтому обнаружить бактериальное ядро на препаратах довольно трудно. Метод окраски бактериальных ядер основан на устранении РНК цитоплазмы гидролизом мазка в соляной кислоте, а затем последующей окраске ДНК.

Метод Романовского–Гимза. Этим методом в клетках прокариот одновременно выявляют геном клетки и волютин. Сначала препарат фиксируют 5 мин метиловым спиртом или фиксатором Карнуа. В последнем случае для удаления следов уксусной кислоты препарат промывают спиртом и тщательно высушивают на воздухе. Окрашивают препарат красителем Романовского–Гимза в течение суток, затем ополаскивают слабощелочной (рН 7,2) водой, высушивают и микроскопируют. Геном окрашивается в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма – в слабо-розовый.

Красители. *Краситель Карнуа* содержит абсолютный спирт, хлороформ, ледяную уксусную кислоту в соотношении 6:3:1. *Краситель Романовского–Гимза.* Промышленность выпускает препарат, представляющий собой смесь азура (органического красителя, полученного из метиленового синего), эозина и метиленового синего. Непосредственно перед употреблением к 10 мл дистиллированной воды, имеющей нейтральную или слабощелочную реакцию (рН 7,2), прибавляют 10 капель красителя.

Реакция Фельгена. Ее применяют для окраски ДНК. При слабом кислотном гидролизе нуклеопротеидов происходит отщепление пуриновых и пиримидиновых оснований, ведущее к высвобождению дезоксирибозы, входящей в ДНК. При гидролизе дезоксирибоза переходит в гидроксилевулиновый альдегид, который взаимодействует с сернистой частью бесцветной фуксинсернистой кислоты, выделяя фуксин красного цвета. В результате геном окрашивается. Препараты бактерий обрабатывают фиксатором Карнуа; 5 мин, промывают абсолютным спиртом, гидролизуют 7 мин в растворе 1 н. HCl, подогретом до 60 °С, погружают на 1–2 мин. в холодный раствор 1 н. HCl и переносят в фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа) на 3–4 ч. Препараты последовательно промывают в трех кюветах с сернистой водой по 20 мин в каждой, затем ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Геном окрашивается в фиолетовый цвет.

2.3. Выявление некоторых цитоплазматических (внутриклеточных) включений. У многих бактерий, выращиваемых в определенных условиях, в результате обменных процессов в цитоплазме образуются отложения, которые называют **включениями**. *Включения* – это вещества, возникающие в результате метаболизма клетки: гранулы углеводной природы – гликоген (животный крахмал) и гранулеза (крахмало-подобное вещество), зерна волютина (запас азота и фосфора в клетке), капли жира и серы, кристаллы щавелевой кислоты, зернышки аморфного карбоната кальция. Эти включения представляют собой продукты клеточного обмена; одни из них следует рассматривать как запасные питательные веще-

ства, другие – как отходы метаболизма клетки. Для выявления этих включений, которые сильно преломляют свет, применяется несколько методов.

Волютин – полифосфат, запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты и служит источником фосфатных групп. Название «волютин» произошло от *Spirillum volutans*, в клетках которой он был впервые обнаружен. Волютин обнаруживается в виде крупных гранул в вакуолях дрожжей или цитоплазме бактерий (уксуснокислых, молочнокислых, азотфиксирующих) и актиномицетов. Включения волютина хорошо выражены в клетках *Asotobacter*, *Spirillum volutans*, *Bac. subtilis*, а также у возбудителей сибирской язвы, дифтерии. Гранулы волютина имеют относительно крупные размеры, окрашиваются различными красителями, изменяя цвет последних. Например, при окрашивании метиленовым синим волютин (имеет к нему сродство) окрашивается в ярко-красный цвет (а не в цвет основного красителя). Такое явление получило название **метахромазии**. Характерные свойства волютина – сродство к основным красителям и метахромазия, т. е. способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества.

Метод Омелянского. Метод окраски основан на плохой растворимости волютина в растворах кислот. На обезжиренное стекло наносят тонкий мазок бактерий, сушат его на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают карболовым фуксином Циля (фуксином основным феноловым Циля). Через 0,5–1 мин. промывают препарат водой, обесцвечивают 20–30 с 1%-ным раствором H_2SO_4 . Серная кислота обесцвечивает цитоплазму, а зерна волютина остаются окрашенными фуксином. промывают, дополнительно 20–30 с окрашивают метиленовым синим (1 : 40), промывают, промокают, наносят масло и смотрят с иммерсионной системой. Гранулы волютина окрашены в красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

Окраска волютина. Окраска волютина производится на культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На приготовленный фиксированный мазок наливают уксуснокислый синий на 1–2 мин. Затем препарат промывают водой. Окрашивают раствором хризоидина 20–30 с. Промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и исследуют под микроскопом с иммерсией. Протоплазма клеток окрашивается в светло-коричневый цвет, зерна волютина – в фиолетовый.

Метод Леффлера. Тонкий мазок культуры микроорганизма высушивают на воздухе, фиксируют на пламени, окрашивают раствором метиленовой сини Леффлера в течение 3-х минут, промывают водой, не высушивая, покрывают покровным стеклом и рассматривают, пользуясь объективом $\times 90$. На препарате зерна волютина окрашены в красновато-

фиолетовый цвет, а цитоплазма – в голубой. Для более ясной дифференциации зерен валютина пользуются растворами кислоты и щелочи. При добавлении под покровное стекло 1% серной кислоты, зерна валютина сохраняют окраску, а цитоплазма обесцвечивается. При добавления 5% раствора соды цитоплазма клетки сохраняет голубой цвет, а зерна валютина – обесцвечиваются.

Включения жировой природы. Жир содержится в клетках практически всех видов микроорганизмов (корневидной, картофельной бацилл, дрожжах), особенно много его накапливается при старении культуры. Жировые включения можно наблюдать в клетках некоторых дрожжей без специальных методов окраски.

Выявление жировых включений в нативном препарате. На предметное стекло наносят каплю физиологического раствора, в ней осторожно размешивают взятую микробиологической петлей культуру дрожжей. Смесь накрывают покровным стеклом и микроскопируют, пользуясь объективом на 90. В клетках дрожжей видны крупные капли жира, сильно преломляющие свет.

Контрастная окраска включений жировой природы.

1. Окрашивают жир у микробов спиртовым раствором Судана III (0,05 г судана III-4 100 мл 96%-ного этилового спирта), для чего к капле культуры добавляют краситель и смешивают. Капли жира окрашиваются в красный цвет, а цитоплазма остается неокрашенной.

2. К капле густой водной взвеси микроорганизма на предметном стекле добавляют каплю 40% формалина и оставляют препарат на 5 минут. Затем к взвеси микроорганизмов добавляют каплю раствора метиленовой сини Леффлера (1 : 30) и окрашивают препарат в течение 10 минут. Потом на него наносят каплю раствора Судана III и оставляют на 5 минут. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют, пользуясь объективом на 90. Жировые включения бактериальных клеток окрашиваются в красновато-розово-оранжевый цвет, цитоплазма – в синий.

Многие гранулы, окрашивающиеся Суданом III или Суданом черным (0,3%-ным раствором в 70%-ном этиленовом спирте), состоят из поли-β-оксимасяной кислоты. Для выявления поли-β-оксимасяной кислоты готовят препарат клеток 24-часовой культуры. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки, окрашивают Суданом черным 5–15 мин. (краситель может при этом высохнуть, но это не имеет значения). Затем краситель смывают, препарат подсушивают фильтровальной бумагой и обрабатывают ксилолом, несколько раз погружая в него стекло. Время обесцвечивания не должно превышать 1 мин. Дополнительное

окрашивание препарата проводят 0,5%-ным водным раствором сафранина в течение 5–10 с. Включения поли- β -оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие гранулы в розовой цитоплазме клеток.

Приготовление Судана III. 0,1 г судана III растворяют в 200 мл 96%-ного спирта или концентрированной молочной кислоты.

2.4. Кислотоустойчивость – свойство, наиболее характерное для микобактерий и некоторых актиномицетов, нокардий. Кислотоустойчивость связана с особенностями химического состава клеточных стенок и обусловлена большим содержанием в клетке сложных липидов, в частности, миколовых кислот. Кислотоустойчивость проявляется в том, что клетки с трудом воспринимают красители, а при окрашивании – прочно их удерживают. Жироподобные вещества (липоиды) с трудом окрашиваются обычными анилиновыми красками. Эти бактерии не окрашиваются обычными методами. Однако если при окрашивании используются фенол (раствор карболового фуксина), детергенты или нагревание, то окрашенные клетки получить удастся, которые не теряют окраски при воздействии на них раствором неорганических кислот и спирта и не воспринимают цвет дополнительной контрастной окраски, т.е. окраска клеток сохраняется даже при последующем обесцвечивании в смеси кислота-спирт.

2.5. Споры. Спорообразование свойственно бактериям нескольких родов, к числу которых относятся *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*. Если диаметр споры не превышает диаметра клетки, в которой спора образуется, клетку называют *бациллярной* (присутствие споры не меняет внешнего вида клетки); если превышает, то в зависимости от расположения споры в центре или на конце клетки эту клетку называют соответственно *кlostридиальной* (клетка расширена в месте нахождения споры и имеет вид веретена или лимона) или *плектридиальной* (спора находится на конце клетки).

Обычно внутри каждой клетки образуется одна спора, которая может размещаться центрально (у бацилл); субтерминально или терминально, превышая диаметр материнской клетки (у кlostридий). Это приводит к формированию у кlostридий клеток веретеновидной формы (*Clostridium perfringens*), разливной ложки (*Clostridium diauocci*), ракетки или барабанной палочки (*Clostridium tetani*). Палочка со спорой называется бациллой.

Бактериальные споры устойчивы к высокой температуре, высушиванию, воздействию токсических веществ и других неблагоприятных факторов. Бактериальные споры могут быть выявлены с использованием как простых, так и сложных методов окраски.

При наблюдении за живыми спорообразующими бактериями их споры можно различить по более сильному преломлению световых лучей. Споры кислотоустойчивы, поэтому с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это большой плотностью оболочки, низкой концентрацией в ней свободной воды и высоким содержанием липидов в спорах. В препаратах, окрашенных простыми способами или по Граму, споры остаются бесцветными (*негативная окраска*).

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочкой на первом этапе окраски спор применяют химические вещества, изменяющие структуру их оболочки. Для того чтобы увеличить проницаемость споры, в краситель добавляют протравитель (карболовую кислоту) и окраску производят при нагревании. Оболочка при этом размягчается, увеличивается порозность. Краситель хорошо адсорбируется, споры не обесцвечиваются при кратковременном воздействии кислотой. Вегетативные же тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и становятся видимыми только при дополнительном окрашивании контрастным красителем.

Однако при последующем прокрашивании споры одновременно прокрашивается и цитоплазма клетки, поэтому под микроскопом последняя выглядит однородно окрашенной. Для того чтобы на препарате оставались прокрашенными только споры, следует такой «перекрашенный» препарат частично обесцветить, забирая краситель у цитоплазмы и оставляя его в споре. Этого достигнуть нетрудно, так как краситель, адсорбированный спорой, удерживается прочнее, чем поглощенный цитоплазмой клетки. Споры красятся труднее, чем вегетативная часть клетки, но и медленнее обесцвечивается в кислотах. Поэтому, если после окрашивания поместить препарат в серную кислоту на определенное время, можно добиться того, что спора останется окрашенной, а вегетативная часть клетки быстро обесцветится. Затем вегетативную клетку легко можно покрасить в контрастный по цвету краситель, чтобы спора и остальная часть клетки были окрашены в разные цвета и расположение спор в клетках было хорошо различимо.

Таким образом, все способы окраски спор основаны на едином принципе: сначала споры протравливают различными веществами: хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, едким натром или перекисью водорода, затем окрашивают клетку со спорой при нагревании и, наконец, обесцвечивают цитоплазму и дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

Например, с использованием 7% водного раствора нигрозина микроорганизм окрашивается в зеленый цвет, споры – бесцветные, а фон – чер-

ный. Наиболее часто используемым сложным методом окрашивания эндоспор является *метод Шеффера–Фултона*. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5% водный раствор малахитового зеленого и 2–3 раза нагревают в пламени спиртовки до появления паров. Фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой и в течении 30с докрашивают 0,5% раствором сафранина. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

Окраска спор у бактерий по методу Циля. Приготовленный мазок высушивают на воздухе, фиксируют на пламени, наносят на него 5% раствор хромовой кислоты в качестве протравы и нагревают в течении 5 мин. до отхождения паров. Далее мазок промывают водой, покрывают полоской фильтровальной бумаги, на которую наносят карболовый раствор фуксина Циля, и подогревают в течении 6–8 минут до образования паров (краску периодически добавляют, не давая мазку подсохнуть). После этого мазок тщательно промывают водой, и на 30–60 секунд наносят на него 1% раствор серной кислоты до приобретения слабо розовой окраски (при этом краситель вымывается из цитоплазмы вегетативных клеток, а споры остаются окрашенными). После дифференциации мазок немедленно промывают и докрашивают раствором метиленовой синьки Леффлера в течении 5 минут, снова промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой. Споры окрашиваются фуксином в ярко-красный цвет, а концы клеток-споросцев и бесспорные палочки – в синий или голубой цвет метиленовой синьки.

Метод Циля–Нильсена в модификации Мюллера. Мюллер, модифицировав известный метод Циля–Нильсена, применяемый обычно для выявления кислотоустойчивости бактерий (дифференциальной окраски микробактерий и некоторых близких к ним микроорганизмов), связанной с особенностями химического состава их оболочки, предложил использовать его для окраски спор бактерий. До фиксации мазка бактерий на пламени препарат готовят обычным способом. Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат наносят 5%-ный раствор хромовой кислоты. Через 5–10 мин. ее смывают водой. Препарат накрывают полоской фильтровальной бумаги и обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля. Подогревают препарат над пламенем до появления паров (не до кипения), затем отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя. Эту процедуру проводят в течение 7 мин. Важно, чтобы краситель испарялся, но бумага не подсыхала. После охлаждения ее снимают, препарат промыва-

ют водой и тщательно промокают фильтровальной бумагой. В результате такой обработки клетки со спорами равномерно прокрашиваются. Далее обесцвечивают цитоплазму клеток (но не споры), обрабатывая 1%-ным раствором соляной или серной кислот в течение 15–30 с. При приготовлении препарата спор *Bacillus mycoides* или *Bacillus mesentericus* рекомендуется обесцвечивать цитоплазму 16–18 с (размеренно считая вслух от 21 до 37–40). При превышении этого времени могут обесцветиться и споры. Затем препарат промывают водой и окрашивают метиленовым синим 2 мин. Если все операции проделаны правильно, окраска получается контрастной и ярко-красные споры четко выделяются на голубом фоне цитоплазмы.

Метод окраски спор по способу Ауески. На приготовленный высушенный на воздухе мазок наливают 1-2% водный раствор соляной кислоты и подогревают на пламени до отхождения паров (3–4 раза). Затем препарат промывают водой, высушивают, фиксируют на пламени и окрашивают через фильтровальную бумагу карболовым раствором фуксина при нагревании (до появления паров) в течении 3–5 минут. Далее препарат обесцвечивают 5% водным раствором серной кислоты в течении нескольких секунд (до бледно-розовой окраски), промывают водой и дополнительно окрашивают раствором метиленовой синьки Леффлера в течении 2-х минут, промывают водой и высушивают. При микроскопии видны споры (красные) и вегетативные формы (синие).

Метод Златогорова. Мазок фиксируют над пламенем горелки. На его поверхность кладут фильтровальную бумагу величиной с покровное стекло, окрашенную фуксином основным феноловым Циля. Бумагу смачивают 3–5 каплями воды. Окрашивание проводят при подогревании в течение 5–7 мин. Чтобы мазок не высохал, во время испарения жидкости к нему (по каплям) добавляют воду. Затем мазок обесцвечивают 3%-ным водным раствором серной кислоты в течение 5–10 с и промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят метиленовым голубым до 2–3 мин., после чего мазок промывают водой и высушивают. В поле зрения микроскопа видно, что споры окрашены в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий.

Метод Пешикова. На фиксированный в пламени препарат наливают метиленовый синий Леффлера, доводят его до кипения и кипятят 15–20 с, держа стекло над пламенем. Мазок промывают водой и докрашивают в течение 30 с 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного. Еще раз промывают, подсушивают и далее исследуют препарат с масляной иммерсией объектива. Микроскопическая картина: споры голубые или синие, молодые споры – черно-синие, вегетативные формы – розовые, включения (хроматиновые) – фиолетовые.

Метод Шефера–Фултона. Расположите фиксированный препарат мазком вверх на параллельные стеклянные рейки, которые лежат над кюветой. На мазок положите кусочек фильтровальной бумаги, на который нанесите раствор красителя “Малахитовый зеленый”. Нагрейте препарат в пламени спиртовки до появления паров. Для этого пронесите препарат несколько раз над пламенем спиртовки мазком вверх до видимого глазу образования паров на поверхности фильтровальной бумаги. После этого бумагу снимите пинцетом, а препарат промойте водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Далее на мазок положите кусочек фильтровальной бумаги, на который нанесите раствор красителя “Фуксин” на 1–2 мин. После завершения окрашивания бумагу снимите пинцетом, а препарат промойте водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем высушите препарат, аккуратно промокая его фильтровальной бумагой. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

2.6. Капсулы. Некоторые микробы способны образовывать капсулу – слизистый слой оболочки, который синтезируется в цитоплазме и секреторируется на поверхность клеточной стенки. Размеры их чаще превышают тело микробной клетки. Химический состав капсул различен: одни из них состоят из комплекса белков, другие – из полисахаридов. Капсула и остальная часть клетки окрашиваются неодинаково. Капсула как бы выполняет роль защиты и часто встречается у патогенных микроорганизмов. Такие микробы образуют капсулы в организме животного и редко на искусственных средах. Колонии капсулообразующих бактерий имеют влажную, блестящую поверхность и называются **мукоидными**. Среди сапрофитных бактерий капсула хорошо выражена у представителей родов *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Rhizobium*, патогенных – *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и др.

Капсула предохраняет клетку от обезвоживания, механического повреждения, капсульное вещество создает вокруг клетки дополнительный осмотический барьер, регулирующий поступление и выделение различных веществ и ионов, а также аэрацию бактерий. Существует несколько методов окрашивания капсул. Лучше всего капсулы выявляются во влажных препаратах, так как составляющие их сильно гидратированные коллоидные полимеры легко разрушаются и сокращаются в размерах при высушивании и фиксации. Капсулы слабо преломляют свет, поэтому в живой, неокрашенной клетке их трудно обнаружить. При обычных методах окраски они остаются бесцветными. Капсульное вещество очень слабо воспринимает окраску, поэтому при простом способе окраски капсула видна в виде слабо-окрашенного ореола вокруг микробной клетки. Для обнаружения капсул лучше пользоваться негативными способами окраски, при

которых окрашивается фон с контрастно выделяющимися неокрашенными капсулами, обрамляющими бактериальные клетки.

Метод Бурри. Каплю туши помещают на хорошо обезжиренное смесью спирта с эфиром предметное стекло и смешивают с каплей жидкости, содержащей бактерии. При помощи покровного стекла распределяют мазок тонким слоем по поверхности предметного стекла. После того как препарат высохнет на воздухе, его рассматривают с иммерсионной системой. На дымчато-темном фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий. Для исследования капсул наиболее удобны клетки азотобактера.

Приготовление туши. Одну часть туши смешивают с девятью частями дистиллированной воды и стерилизуют при 1 атм 30 мин в пробирках, закрытых ватными пробками. Вместо стерилизации можно добавлять к туши несколько капель формалина. Подготовленную таким образом тушь выдерживают две недели, пока все взмученные частицы не осядут на дно. Для приготовления препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшейся жидкости.

Метод Ольта. Мазок окрашивают 2–3%-ным раствором сафранина. Краситель готовят перед употреблением, растворяя его в горячей воде с последующим фильтрованием. Окрашивают при легком нагревании в течение 1–3 мин. и быстро промывают водой. Препарат не высушивают, на нем должна быть вода, накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Световые лучи, проходя через слой воды, усиливают разницу в преломлении лучей от капсулы и тела микробной клетки. В поле зрения микроскопа видно, что тела микробных клеток окрашены в красный цвет, капсулы – в желтый.

Метод Михина. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым голубым Лёффлера (лучше старым раствором) в течение 2–3 мин. при подогревании. Краситель быстро смывают водой, мазок высушивают. Микроскопическая картина: тела микробных клеток темно-синие, капсулы – светло-розовые.

Окраска капсул по методу Гинса. На хорошо обезжиренное предметное стекло (ближе к его концу) с помощью пастеровской пипетки или микробиологической петли помещают каплю черной туши, в нее вносят исследуемый материал. Жидкость перемешивают и ребром второго предметного или покровного стекла делают мазок по поверхности первого. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют смесью Никифорова в течение 5–10 минут и окрашивают раствором карболового фуксина Циля, разбавленного водой 1 : 3, в течение 2–3 минут. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют. На темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Лабораторный практикум

Работа 1. ОКРАСКА НУКЛЕОИДА

1. Нанести мазок на предметное стекло.
2. Мазок высушить на воздухе.
3. На дно чашки Петри нанести 2–3 капли фиксатора (формалин), битое стекло, на обрезки которого поместить предметное стекло с препаратом (мазком вниз). Мазок фиксируется в парах формалина в течении 2–3 мин.
4. Химический стакан с 1 н. соляной кислотой поместить на водяную баню (в вытяжном шкафу!).
5. Погрузить препарат в соляную кислоту (при температуре 60°C) на 2–3 мин. – гидролиз мазка.
6. Немедленно тщательно промыть водой.
7. Мазок залить раствором формалина на 1,5 мин и вновь промыть водой.
8. Мазок окрасить р-ром фуксина 1-2 мин, промыть водой, высушить на воздухе, микроскопировать в иммерсионной системе.

Нуклеоид выглядит в виде одного образования неопределенной формы по центру клетки либо в виде двух телец вблизи полюсов клетки. Он окрашен в ярко малиновый цвет, цитоплазма – в розовый.

Работа 2. ОКРАСКА СПОР

2.1. Окраска по Ожешко.

1. Мазок на краю предметного стекла, высушить на воздухе.
2. Налить несколько капель 0,5–1% хлороводородной кислоты, подогреть (2–3 мин.) до образования паров.
3. Слить кислоту, остудить, промыть водой, просушить, фиксировать над пламенем. Оболочка спор размягчается, становится доступной для красителя.

2.2. Окраска по Цилю.

1. Высушить мазок на воздухе, фиксировать над пламенем.
2. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и хорошо смачивают ее фуксином Циля;
3. Препарат подогревают, держа высоко над пламенем, до появления паров, но не доводят до кипения краски на стекле. Когда бумажка подсохнет, подливают новую порцию красителя и опять подогревают. Эту процедуру проводят 3–4 раза, после чего бумажку выбрасывают;
4. Остудить, на мазок налить 1%-ной серной кислотой на несколько секунд для обесцвечивания вегетативной части клеток;

5. Препарат после обработки кислотой тщательно промывают водой;
6. Подкрашивают клетки метиленовым синим 1–2 мин.
7. Препарат промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой и исследуют под микроскопом с иммерсией. Споры окрашиваются в розовый цвет, вегетативная часть клеток – в голубой.

Работа 3. ВЫЯВЛЕНИЕ КАПСУЛЫ

3.1. Окраска по Бурри-Гинсу. Негативный метод окрашивания, т.к. фон препарата и бактериальные клетки окрашиваются, а капсула остается неокрашенной.

1. На край предметного стекла нанести каплю черной туши (разведение 1 к 9: 1 часть туши – 9 частей воды), в нее внести каплю баккультуры. Ребром другого предметного стекла сделать мазок (как мазок крови), высушить на воздухе.

2. Фиксировать спиртом. Промыть водой.

3. Окрасить фуксином Пфейффера 3-5 мин., промыть, высушить на воздухе.

4. Микроскопировать в иммерсионной системе. Фон препарата черный, капсулы – неокрашенные.

3.2. Окраска по Баху, модифицированной В.Г. Дроботько.

1. На предметное стекло нанести каплю 3%-ого водного раствора конго-красного.

2. В краситель внести культуру бактерий.

3. Мазок просушить при комнатной температуре без фиксации.

4. Мазок сверху обработать солянокислым спиртовым раствором кислого фуксина (10 г фуксина, 100 мл спирта, 3 мл соляной кислоты) в течение 20–30 сек.

5. Промыть водой из промывалки, высушить фильтровальной бумагой, досушить под настольной лампой, положить на предметный столик микроскопа, выдержать несколько минут, добавить иммерсионное масло, исследовать.

Работа 4. ОКРАСКА ЖГУТИКОВ

1. Бактериальную суспензию нанести на предметное стекло и высушить на воздухе.

2. Восковым стеклоглафом очертить вокруг бактериальной пленки ареол (прямоугольник или круг).

3. Нанести на предметное стекло 1 мл раствора красителя таким образом, чтобы он не вытекал за пределы восковой линии.

4. Оставить краситель на определенное время (до 1 часа). В состав красителя входят 1,5% хлористого натрия, 3% таннина (дубильной кислоты), 0,03% фуксина.

5. Как только на поверхности красителя образуется золотистая пленка, а по всему мазку выпадет осадок, краситель удалить под струей воды.

6. Препарат высушить на воздухе.

7. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Клетки бактерий окрашиваются в красный цвет, жгутики принимают вид толстых нитей, отходящих от клетки.

Работа 5. ОКРАСКА ГЛИКОГЕНА

Окраска гликогена производится на культуре дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для выявления гликогена готовят препарат «раздавленная капля».

1. На чистое предметное стекло нанести каплю жидкой культуры дрожжей.

2. Добавить к ней каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом, капать на него сверху каплю иммерсионного масла и рассмотреть в иммерсионной системой микроскопа. Если препарат нагреть до 60°C, то окраска гликогена исчезнет. Если затем охладить препарат, она вновь восстановится.

Гликоген в клетках дрожжей приобретает красновато-коричневый цвет.

Работа 6. ОКРАСКА ГРАНУЛЕЗЫ

Окраска гранулезы производится на культуре маслянокислых бактерий – *Clostridium butyricum* или *Clostridium pasteurianum*. Для выявления гранулезы готовят препарат «раздавленная капля».

1. На предметное стекло нанести каплю жидкой культуры бактерий,

2. Добавить к ней каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом, сверху на него нанести иммерсионное масло и просмотреть препарат иммерсионным объективом.

3. Найти подвижные палочки. Клетки постепенно замедляют свое движение в результате проникновения в них йода, который убивает их и окрашивает гранулезу в сине-фиолетовый цвет. У спорных форм неокрашенными остаются только расположенные на одном из концов клетки споры. Зарисовывать цветными карандашами.

Работа 7. ОКРАСКА ВОЛЮТИНА.

1. Обезжирить стекло (смесью Никифорова).
2. Нанести тонкий мазок бактерий.
3. Сушить на воздухе, фиксировать над пламенем.
4. Окрасить фуксином Циля 0,5–1 мин.
5. Промыть водой.
6. Обесцветить 1%-ным раствором H_2SO_4 20–30 сек.
7. Промыть водой.
8. Окрасить метиленовым синим (1 : 40) 20–30 сек.
9. Промыть водой, высушить фильтровальной бумагой, нанести масло, посмотреть под иммерсионной системой.

Работа 8. ОКРАСКА ВКЛЮЧЕНИЙ ЖИРОВОЙ ПРИРОДЫ

1. На предметное стекло нанести небольшую каплю 40%-ного раствора формалина.
2. Петлей в нее внести культуру микроорганизма. Формалин убивает клетки и разрыхляет их оболочки.
3. Оставить на 5 мин.
4. Добавить каплю метиленового синего к взвеси микроорганизмов (1:30), окрашивать 10 мин.
5. На препарат внести каплю раствора судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ), выдержать 5 мин.
6. Препарат накрыть покровным стеклом, удалить избыток жидкости фильтровальной бумагой, микроскопировать на 40x и 90x.

лудочно-кишечном тракте животных. В качестве источника энергии они используют главным образом моно- и дисахариды (полисахариды сбраживают лишь некоторые виды).

Молочнокислым бактериям требуются для питания органические формы азота. Они хорошо развиваются на аминокислотах, пептидах и полипептидах, могут усваивать и белки. Кроме углерода и азота, молочнокислым бактериям необходимы фосфор, калий, кальций и другие элементы, получаемые из различных минеральных соединений. Эти бактерии нуждаются также в ростовых веществах. Интересно, что, используя одно ростовое вещество, например рибофлавин, они обогащают среду, на которой развиваются, другими ростовыми веществами, например витамином В₁.

Молочнокислые бактерии могут развиваться в довольно большом температурном диапазоне. Для большинства из них он составляет 7...42°C при оптимуме 30...40°C. Оптимальная реакция среды для этих бактерий нейтральная. Однако в процессе жизнедеятельности они значительно подкисляют питательную среду, в связи с чем приспособились к существованию при довольно низких рН.

Кокковидные формы молочнокислых бактерий, осуществляющих гомоферментативное брожение, представлены родами стрептококкус и педиококкус. Клетки бактерий рода стрептококкус круглые или слегка овальные, диаметром 0,5...1 мкм, расположены единично, парами или цепочками. Встречаются мезофильные и термофильные виды рода. Стрептококки широко распространены в природе, они встречаются на растениях, в почве, навозе, обнаруживаются в молоке и других субстратах. Эти бактерии используют при производстве кисломолочных продуктов, кисломолочного масла и сыров.

Представители рода педиококкус – грамположительные, неспорообразующие, неподвижные кокки, располагающиеся кучками, тетрадами, парами или единично. Оптимальное значение рН для них – 5. Эти бактерии предпочитают анаэробные условия, развиваются в бродящих растительных материалах – квашеных овощах, силосе, а также сыре, молоке, в пищеварительном тракте животных и т. д. Палочковидные бактерии, вызывающие гомоферментативное молочнокислое брожение, представлены видами рода лактобациллюс. Клетки этих бактерий очень разнообразной формы, которая может меняться от шаровидной до нитевидной. Встречаются они, как правило, в виде единичных клеток, парами или цепочками, обнаруживаются в молоке, зерне, мясных продуктах, пиве, вине, соленьях и маринадах, в воде и сточных водах, а также в ротовой полости и кишечном тракте человека и животных. Для бактерий рода лактобациллюс оптимум рН 5,5–5,8, но они могут развиваться и при рН 5 и ниже.

Гомоферментативные молочнокислые палочковидные бактерии делят на две группы. Первая группа представлена термофильными организмами, растущими при 45°C и выше и не развивающимися при 20°C и ниже. К ним относят молочную палочку – лактобациллу лактис (*Lactobacillus lactis*), ацидофильную палочку – лактобациллу ацидоphilус (*L. acidophilus*), сырную палочку – лактобациллу казеи (*L. casei*), болгарскую палочку – лактобациллу булгарикус (*L. bulgaricus*) и другие бактерии. Вторая группа гомоферментативных молочнокислых бактерий представлена стрептобактериями, которые развиваются в молоке и образуют короткие цепочки. Молочнокислые палочки этой группы менее активны. Они развиваются при температуре 15...38°C, оптимум составляет 30°C. Стрептобактерии играют важную роль при созревании сыров, квашении овощей и силосовании.

Гетероферментативное молочнокислое брожение осуществляют бактерии родов лейконосток, лактобациллу и бифидобактериум (*Bifidobacterium*). Клетки бактерий рода лейконосток имеют чечевицеобразную или сферическую форму, расположены единично, парами или короткими цепочками, грамположительные, неспорообразующие, факультативные анаэробы. Оптимум температуры для их развития составляет 20–30°C. Эти бактерии обнаруживаются главным образом на растительных материалах, иногда в молоке и играют большую роль при квашении капусты, силосовании, в масло- и сыроделии. Гетероферментативные лактобациллы – небольшие палочки. Максимальная температура, при которой они могут развиваться, – около 45°C. Встречаются указанные бациллы на растениях, присутствуют и в хлебных заквасках.

Клетки бифидобактерий – прямые или разветвленные палочки, раздвоенные, V-формы, булабовидной или лопатовидной формы. Они не образуют спор, неподвижные, грамположительные, анаэробы, оптимум температуры для бактерий этого рода составляет 36...38°C. Бифидобактерий обнаружены в кишечнике человека, животных, насекомых.

Для изготовления молочнокислых продуктов используются чистые культуры молочнокислых бактерий или в соединении с дрожжами и др. Простокваша (северная, европейская) приготавливается путем сквашивания пастеризованного или кипяченого молока чистой культурой молочнокислых стрептококков (температура созревания 25-30°C). Лактобациллин – болгарская «мечниковская» простокваша заквашивается двумя культурами: молочнокислым стрептококком и болгарской палочкой. Закваской для кефира служат кефирные зерна, «грибки», представляющие собой биосимбиоз молочнокислых бактерий (*Lactobacillus casei*), стрептококков, дрожжей (*Saccharomyces kefir*) и микроорганизмов, вызывающих пептонизацию мо-

лока. В препарате из кефира видны молочнокислые стрептококки, клетки дрожжей. Во время созревания кефира параллельно протекают два процесса брожения – молочнокислое и спиртовое. Кумыс, как и кефир, также продукт комбинированного брожения – молочнокислого и спиртового, но в отличие от кефира протекает под действием молочнокислых палочек: болгарской, ацидофильной. Кумыс готовится из парного молока кобыл, в котором более высокое содержание сахара (6%) по сравнению с коровьим, поэтому спиртовое брожение протекает значительно интенсивнее. Кумыс готовится из молока других животных: верблюжьего, коровьего (но к последнему добавляют сахар – до 6%). Ацидофильно-дрожжевое молоко приготавливается из коровьего молока на чистых культурах ацидофильной палочки и дрожжей. При своем развитии в молоке эти микроорганизмы сбраживают лактозу, выделяют антибиотические вещества, губительно действующих на возбудителей кишечных заболеваний и туберкулеза. Ацидофильно-дрожжевое молоко является вспомогательным средством при лечении этих заболеваний.

В кисломолочных продуктах наблюдается иногда излишняя кислотность, вспучивание (творог, сметана и др.), тягучесть, горечь, плесневелость. Это связано с изменением микробиологических процессов под действием посторонней микрофлоры. Для изучения молочнокислого брожения лучше всего в качестве питательной среды пользоваться молоком. В нем имеются все питательные вещества для развития молочнокислых бактерий (лактоза, белок, фосфор, витамины).

В образовании молочнокислых продуктов участвуют гомоферментативные молочнокислые бактерии. Простокваша содержит почти чистую культуру молочного стрептококка *Streptococcus lactis*. Клетки молочного стрептококка мелкие (диаметром до 1 мкм), имеют овальную форму, у молодых культур в виде коротких цепочек, а у старых – соединены попарно. Кефир – молочнокислый продукт смешанных брожений. Содержит возбудителей молочнокислого брожения – молочный стрептококк *Streptococcus lactis* (в кефире образует довольно длинные цепочки) и казеиновую палочку *Lactobacterium casei*, а также возбудителей спиртового брожения – кефирные дрожжи *Saccharomyces kefire*. Ацидофилин или ацидофильная простокваша – содержит только молочнокислую бактерию – ацидофильную палочку *Lactobacterium acidophilum* (длиной 4–5 мкм).

Если молочные продукты хранятся при комнатной температуре, на их поверхности появляется бархатистая морщинистая пленка молочной плесени *Oidium lactis*. Это явление нежелательное, так как молочная плесень окисляет молочную кислоту до CO_2 и H_2O , кислотность снижается, тогда в продуктах могут развиваться гнилостные бактерии и вызывать их порчу.

Лабораторный практикум

Работа 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ-МАЗКОВ ИЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ ПРОДУКТОВ

При высоких температурах происходит денатурация белков, поэтому препараты из молочнокислых продуктов не фиксируют над пламенем. Бактериологическую петлю вводят в ступок и, повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь петлей к пленке. Ступок размазывают на предметном стекле очень тонким слоем без воды, сушат на воздухе или у пламени горелки (но на значительном расстоянии). Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1 : 1), несколько раз нанося избыток ее на мазок и сливая. При такой фиксации бактерии погибают и прикрепляются к стеклу, а жир извлекается эфиром и улетучивается. Капли жира на препарате мешают окраске и микрокопированию.

1. Обезжирить стекло кусочком хозяйственного мыла, протереть салфеткой.

2. Взять исследуемый продукт зубочисткой, сделать мазок очень тонким слоем на сухом обезжиренном стекле.

3. Высушить мазок только на воздухе (нельзя держать высоко над пламенем).

4. Положить предметное стекло на стеклянный мостик, капать фиксатор на мазок, удерживая смесь 1–2 мин. Фиксировать в фиксаторе 3–4 раза. Спирт убивает и закрепляет микробный материал на стекле, а эфир обезжиривает препараты.

5. После фиксации дождаться полного испарения со стекла спирта и эфира.

6. Окрасить препарат метиленовым синим 3–5 мин.

7. Промыть препарат водой.

8. Просушить фильтровальной бумагой. Просматривают препараты, пользуясь иммерсионной системой. Результаты исследований заносят в таблицу.

Метиленовый синий – лучший краситель для молочнокислых бактерий молока, так как он слабо окрашивает основной фон – казеин и хорошо – клетки. В приготовленном препарате ясно видны мелкие округлые клетки молочного стрептококка – стрептококкус лактис (*Streptococcus lactis*), соединенные в короткие цепочки. Оптимальная температура его развития 30°C. Этот вид накапливает до 1% молочной кислоты.

Нередко на препарате видны тонкие палочки бактерий рода лактобациллус, содержащие зерна волютина. Чаще встречается болгарская па-

лочка – лактобациллюс булгарикус – возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура его развития 40°C, он очень кислотоустойчив и накапливает до 3,5% молочной кислоты.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, в мазке обнаруживается и молочная плесень – геотрихум кандидум, четырехугольные или овальные клетки которой легко отличаются от молочнокислых бактерий своими размерами.

В поле зрения обнаруживаются мелкие овальные кокки, расположенные по 2–3 клетки, зерна «кефирного грибка», цепочки кокков (стрептококки) и крупные палочки. Могут встретиться и посторонняя микрофлора.

Работа 2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ

Для выявления молочной кислоты, образовавшейся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий, провести качественную реакцию, применяя пробу с фенолом (реакция Уффельмана). От прибавления нескольких капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, он становится желтоватым.

1. В пробирку налить прокисшее молоко – контроль на содержание молочной кислоты (на 1,5–2 см высоты пробирки), поставить пробирку в штатив.

2. В другие пробирки налить исследуемые молочнокислые продукты питания, поставить в штатив.

3. Во все исследуемые пробирки добавить по 10 мл 5% р-ра фенола.

4. Во все исследуемые пробирки добавить по несколько капель слабого р-ра хлорного железа.

5. Цвет первой пробирки принять как основу для сравнения для проведения качественного анализа и сравнивать с ним цвет растворов в других пробирках.

6. Сделать вывод о содержании молочной кислоты в анализируемых продуктах, отметьте результат исследований в табл.

Характеристика молочнокислых продуктов питания

Название молочного продукта	Название микрофлоры	Рисунок микрофлоры	Наличие молочной кислоты

Работа 3. ИССЛЕДОВАНИЕ КВАШЕННЫХ ПРОДУКТОВ

В заквашенных продуктах чаще встречаются возбудители гетероферментного брожения (палочковидные бактерии из рода *Bifidobacterium* и кокки из рода *Leuconostoc*). Молочнокислое брожение лежит в основе квашения капусты, огурцов и др.

1. Выжать сок из заквашенных продуктов и определить его кислотность с помощью индикаторной бумаги для определения pH.

2. Затем сделать препараты-отпечатки. Берут пинцетом объект исследования и плотно прижимают его к предметному стеклу. Можно положить на предметное стекло и прижать его другим стеклом, тогда сразу на двух стеклах получится отпечаток.

3. Использованный растительный материал удалить со стекла, мазок сушить, фиксировать на пламени и окрашивать кристаллвиолетом или метиленовым синим 2–3 мин. Рассматривать препараты, пользуясь иммерсионной системой микроскопа.

4. Препараты-мазки окрасить на включения бактериальной клетки – волютин по методу Омелянского. На препаратах в клетках молочнокислых бактерий зерна валютина будут красновато-фиолетовыми, цитоплазма – голубой.

5. Зарисовать в тетради и подписать микрофлору квашеных продуктов.

Работа 4. ПОДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМА № 4

4.1. Исследование микрофлоры воздуха (по методу оседания коха).

1. В чашки Петри разлить расплавленный на водяной бане мясопептонный агар. При разливе крышку чашки Петри открывают не полностью, а на столько, чтобы под нее вошло горлышко колбы. Верхнюю часть колбы при разливе обжигают над пламенем спиртовки. Разлив производится на строго горизонтальной поверхности, чтобы агар распределился равномерно по дну чашки. С этой же целью сразу, после того как агар выльют в чашку и закроют ее крышкой, чашку двигают по столу вращательными движениями и оставляют на столе до застывания агара (20 мин.).

2. В избранном для анализа микрофлоры воздуха помещении чашки поставить на горизонтальную поверхность и открыть крышки на 5–10 мин. Исследователь должен находиться вдали от чашек. Затем чашки закрыть, пометить маркером и поместить вверх дном в термостат с температурой 30–35°C на 1-2-5 суток.

4.2. Микробиологическое исследование воды.

Для анализа необходимо 2 л воды. Пробы воды берут в чистые сухие стеклянные бутылки с притертыми пробками и тут же доставляют на ана-

лиз (зимой предохраняют пробу от замерзания, а летом – от переохлаждения). Стерильную бутылку привязать к деревянному шесту, к пробке привязать шнур, опустить шест, выдернуть пробку, после заполнения водой достать на поверхность бутылку, закрыть стерильной крышкой.

Правила забора проб воды: Пробы воды из естественных источников (реки, озера) берут на глубине 0,5–1 м и на расстоянии от берега 1–2 м. Из колодцев пробу воды отбирают дважды – утром до начала забора воды и вечером после разбора. При наличии источника загрязнения берут три пробы воды – выше источника загрязнения, напротив него и ниже по течению.

1. 20 мл исследуемой воды центрифугируйте 15 мин. при 1500 оборотах.

2. Верхний слой воды слейте или грушей со стеклянной палочкой отберите, оставьте в пробирке 5 мл воды.

3. Осадок встряхните, отберите по 0,5 мл взвеси, налейте в стерильные чашки Петри, добавьте по 10 мл расплавленного и остуженного до 45°C мясопептонного агара.

4. Покачивая чашку, осторожно смешать агар с водой, дать застыть агару, поставить чашки в термостат вверх дном на 1–3 суток.

При взятии проб водопроводной воды: подготовить две пробирки со стерильной водой, три стерильные чашки Петри, три пипетки. 10–15 мин. спускать воду из водопровода, обжечь кран спиртовкой, набрать воду в стерильную колбу.

1. Пипеткой отобрать 2 мл исследуемой воды.

2. 1 мл внести в первую стерильную чашку (чашка 1 – неразведенная вода) и 1 мл в первую пробирку с 9 мл стерильной воды.

3. Второй пипеткой перемешать воду в первой пробирке (разведение 1 : 10), отобрать 2 мл данного разведения воды, 1 мл воды данного разведения перенести во вторую стерильную чашку (чашка 1 : 10 или 10^{-1}) и 1 мл во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды (не перемешивать!).

4. Третьей пипеткой перемешать воду во второй пробирке (разведение 10^{-2}) и перенести 1 мл в третью чашку (чашка 1 : 100 или 10^{-2}).

5. Таким образом, в трех чашках по 1 мл воды в разведениях 10^{-2} , 10^{-1} и неразведенная проба. В каждую чашку вылить 10–12 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА.

6. Чашку закрыть крышкой. Круговыми движениями по столу перемешать расплавленный МПА с водой. Оставить на 15 мин. до застывания агара.

7. Поставить в термостат (35–37°C) чашки вверх дном на 2–3 суток.

4.3. Микробиологическое исследование почвы

1. Отобрать образцы почвы методом квадрата или по диагонали в стерильную банку, смешать образцы.

2. Их средней пробы отобрать 1 г почвы, перенести в колбу с 99 мл стерильной воды (разведение 1 : 100 или 10^{-2}).

3. Из разведения 10^{-2} отобрать 1 мл воды и перенести в пробирку с 9 мл стерильной воды (разведение 1 : 1000 или 10^{-3}) и т.д.

Схема приготовления разведений:

10^{-2} : 1 г почвы + 99 мл стерильной воды,

10^{-3} : 1 мл разведения 10^{-2} + 9 мл стерильной воды,

10^{-4} : 1 мл разведения 10^{-3} + 9 мл стерильной воды,

10^{-5} : 1 мл разведения 10^{-4} + 9 мл стерильной воды.

4. Из последних двух разведений отобрать по 1 мл воды, внести в стерильные чашки, залить по 10–12 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА, круговыми движениями чашки по столу перемешать содержимое, оставить на 15 мин. чашки до полного застывания агара.

5. Чашки вверх дном поставить в термостат на 2–5 суток.

6. Для определения влажности почвы: стерильный стеклянный или металлический бюкс взвесить, внести в него 10 г почвы. Сушить почву при 105°C до постоянной массы.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 4

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА, ВОДЫ, ПОЧВЫ

Цель: изучить микроорганизмы, содержащиеся в воздухе, воде, почве.

Задачи:

1. Ознакомиться с методиками культивирования и исследований бактерий, содержащихся в воздухе помещений, в воде природных источников и водопровода, в почве экосистемы цветочного горшка и естественных биогеоценозов.

2. Освоить методику выделения чистых культур микроорганизмов.

Методические указания

Клетки микроорганизмов, попав в питательную среду, начинают размножаться и образуют видимые невооруженным глазом колонии. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной **колониеобразующей единицы (КОЕ)**, которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору, кусочек мицелия актиномицета или гриба. Через 48 ч инкубации чашки вынимают из термостата и предварительно подсчитывают число колоний. В связи с тем что существуют медленно растущие формы бактерий, окончательный подсчет делают на 5-е сут.

Учет численности КОЕ в почве. Сначала готовят суспензии (методом разведения), содержащие разные концентрации почвы в 1 мл воды. Для берут навеску почвы в 1 г. Навеску почвы, соблюдая условия асептики, переносят в колбу на 250 мл с 99 мл стерильной воды. Смесь взбалтывают 5 мин, не смачивая пробку. Стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии, содержащей 10^{-2} г почвы, и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Пипетку неоднократно промывают водой в пробирке, чтобы максимально смыть клетки с ее стенок. Другой стерильной пипеткой берут из колбы еще 1 мл суспензии и помещают во вторую колбу, также содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды. Эту пипетку промывают таким же образом, как и в первом случае. Пробирку и вторую колбу взбалтывают 1 мин. Концентрация почвы в пробирке будет 10^{-3} г, во второй колбе – 10^{-4} г. Точно так же новыми стерильными пипетками переносят по 1 мл суспензии из второй колбы во вторую пробирку с 9 мл и в третью колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды и готовят новые суспензии, содержащие в 1 мл соответственно 10^{-5} и 10^{-6} г почвы.

Для определения численности микроорганизмов в каждом разведении методом питательных пластин можно провести глубинный или поверхностный посев. Последний более сложен и занимает больше времени. Поэтому для подсчета численности бактерий в почве методом питательных пластин можно ограничиться глубинным посевом, а поверхностный использовать при учете численности различных физиологических групп микроорганизмов на плотных средах

Для определения количества живых клеток, содержащихся в 1 мл суспензии каждого разведения, берут по 1 мл этих суспензий и переносят в стерильные чашки Петри, используя всякий раз новую стерильную пипетку. На крышках чашек отмечают исследуемый вариант и разведение. Затем в чашки Петри вливают расплавленный МПА, заранее приготовленный и разлитый в пробирки на 20 мл ($\frac{2}{3}$ объема) из расчета одна пробирка на чашку. Температура агара должна быть примерно 45°C. Ее определяют, прикладывая пробирку с расплавленным агаром к щеке: если щеке не горячо – средю можно вылить в чашку Петри. Осторожными круговыми движениями чашки, не смачивая крышку, агар перемешивают с суспензией. Чашки с застывшим агаром переворачивают вверх дном, чтобы избежать попадания на его поверхность конденсационной влаги с крышки, и помещают в термостат при 28–30°C.

Количество КОЕ в 1 г сырой почвы устанавливают, умножая число колоний в чашке на степень разведения – число, показывающее, во сколько раз в каждом конкретном случае разбавили 1 г почвы. При высоких разведениях вырастают единичные колонии (меньше 10 на чашке), которые могут образоваться от случайно попавших клеток из воздуха при внесении в чашку почвенной суспензии или питательной среды. Учет таких чашек делает подсчет недостоверным. Для правильного определения численности КОЕ подсчитывают только чашки, в которых колоний свыше 10 и не более 250–300 (в последнем случае при условии, если колонии очень мелкие).

При подсчете колоний чашки просматривают в проходящем свете и, чтобы дважды не учитывать одни и те же колонии, подсчитанные отмечают чернилами или тушью. Чтобы не пропустить мелкоточечные колонии, чашки дополнительно просматривают под лупой.

Недостатки метода питательных пластин: 1) отсутствие универсальной среды для развития всех микроорганизмов, обитающих в почве. Питание у разных бактерий специфично, и на каждой среде выявляется довольно узкая физиологическая группа. Так, на МПА развиваются в основном гнилостные бактерии, способные усваивать легко доступные ор-

ганические формы азота. Нитрифицирующие, целлюлозоразрушающие, азотфиксирующие и другие бактерии на этой среде не развиваются. Для более полного представления о населенности почвы делают посе­вы на элективные среды или используют метод прямого подсчета микроорганизмов под микроскопом; 2) вероятность неполного учета клеток в образце в связи с тем, что в одном месте в агаре может застыть не одна, а несколько клеток. Образованные ими колонии сливаются, создавая впечатление одной колонии. Если такие колонии имеют неоднородную структуру, можно внести поправку при подсчете, приготовив из них окрашенный препарат. Если под микроскопом обнаруживаются разные формы клеток, например кокки, палочки и сар дины, то считают, что это не одна колония, а, как в данном примере, три. Если все формы клеток одинаковые, то расценивают колонию как результат развития одной клетки (хотя в этом месте одинаковых клеток могло быть 5, 10 и более).

Для сравнения количества КОЕ в разных почвах необходимо подсчитать их число в 1 г *абсолютно сухой* почвы. С этой целью одновременно со взятием навески почвы для приготовления разведений в отдельный бюкс (металлический или стеклянный), высушенный до постоянной массы, берут навеску (5–10 г) для определения влажности почвы. Сушат почву при 105°C до постоянной массы. Для определения числа КОЕ в 1 г сырой почвы определяют разность между массами сырой и сухой почвы, делят ее на массу навески и умножают на 100. Затем число клеток в 1 г сырой почвы надо разделить на количество абсолютно сухой почвы, содержащейся в 1 г сырой почвы.

Пример расчета. В 1 г сырой почвы содержится 5600 клеток. При влажности почвы 30% это число клеток будет соответствовать 0,7 г абсолютно сухой почвы. Определяем численность клеток в 1 г абсолютно сухой почвы: 0,7 г абсолютно сухой почвы содержат 5600 клеток, а 1,0 г – X клеток. Таким образом, в 1 г абсолютно сухой почвы содержится 8 тыс. живых клеток.

Учет численности КОЕ в воде и других жидкостях. Число микроорганизмов в воде, навозной жиже, огуречном рассоле и других жидких субстратах можно определять различными методами. Если исследование ведут, пользуясь методом питательных пластин, то сначала воду и другие исследуемые жидкости 3 мин. хорошо взбалтывают. Затем берут стерильной пипеткой 1 мл жидкости и вносят ее в 99 мл стерильной водопроводной воды. Это – исходное разбавление субстрата в 100 раз. Другой стерильной пипеткой набирают 10 мл исходного разведения и вносят в 90 мл воды, взбалтывают 5 мин. и далее готовят методом разведения разные концентрации исследуемой жидкости и определяют число КОЕ в 1 мл как при определении численности КОЕ в почве.

Учет численности КОЕ в воздухе. Для определения количества КОЕ в воздухе можно использовать **метод Коха** (осаждение клеток микроорганизмов на плотных питательных средах). Стерильные чашки Петри с питательной средой (МПА, МПЖ или кусок вареной картофелины) открывают в исследуемом помещении (или на исследуемой площади) на 5–10 мин. Частицы пыли с бактериями под действием силы тяжести оседают на поверхность плотной питательной среды. Через 48 ч инкубации при 28–30°С осевшие бактерии образуют на среде колонии, которые можно подсчитать. Поскольку некоторые микроорганизмы развиваются медленно, окончательно подсчитывают колонии на 5-е сут. В исследуемых помещениях чашки Петри с агаром лучше размещать по 2–3. После подсчета колоний в каждой чашке выводят их среднее арифметическое значение.

На площади в 100 см² за 5 мин. осажается примерно столько клеток, сколько их находится в 10 л воздуха (0,01 м³). Зная площадь чашки Петри, можно подсчитать количество клеток в 1 м³ воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на 100 см² и далее – в 1 м³ воздуха.

Пример расчета. В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний. Площадь чашки (πr^2) составит $3,14 \cdot 5^2 = 78,5$ (см²). Далее подсчитывают число клеток на 100 см² (равнозначных 10 л, или 0,01 м³ воздуха): 78,5 см² воздуха содержат 45 клеток, а 100,0 см² – X клеток. Таким образом, в 0,01 м³ воздуха находится 57 клеток, а в 1 м³ их будет в 100 раз больше – 5700.

Лабораторный практикум

Работа 1. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА

(по методу осаждения Коха)

Оценку воздуха проводят для того, чтобы определить общее количество микроорганизмов в 1 м³ и возбудителей инфекционных заболеваний. О степени загрязненности воздуха микроорганизмами делают вывод по количеству выросших колоний (считается, что из одной клетки образуется колония). Учитывают тот факт, что на 100 см² за 5 мин. оседает столько же микробов, сколько содержится в 10 л воздуха (0,01 м³). Число прокариотических клеток необходимо рассчитать в 1 м³ воздуха с учетом площади чашки Петри. Диаметр чашки Петри 10 см. Площадь чашки 78,5 см² ($3,14 \cdot 25 = 78,5$).

1. Подсчитайте количество колоний в чашке. Например, выросло 25 колоний.

2. Рассчитайте количество прокариотических клеток на 100 см^2 воздуха. Например,

$$78,5 \text{ см}^2 - 25 \text{ колоний}$$

$$100 \text{ см}^2 - X \text{ колоний}$$

$$X = (100 \cdot 25) / 78,5 = 32.$$

3. Рассчитайте количество клеток микроорганизмов в 1 м^3 воздуха. Например, в $0,01 \text{ м}^3$ воздуха содержится 32 микроорганизма, следовательно, в 1 м^3 их будет в 100 раз больше, т.е. 3200.

4. Проведите санитарно-бактериологическую оценку воздуха в соответствии с данными таблицы 1. Сделайте вывод.

Таблица 1

Санитарная оценка воздуха по бактериологическим показателям

Воздух	Общее количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха	
	Летний режим	Зимний режим
Чистый	1500	4500
Загрязненный	2500	7000

5. Определите количественный и качественный состав микрофлоры воздуха. Для этого посчитайте число внешне одноклеточных колоний, опишите их культуральные признаки. Из каждой колонии сделайте препарат и окрасьте по Граму.

6. Внесите данные в таблицу 2.

Работа 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ

Исследование воды проводится с целью выявления общей микробной загрязненности.

1. Подсчитайте число колоний. Например, выросло 25 колоний

2. Сделайте пересчет на 1 мл воды. Например,

$$0,5 \text{ мл} - 25 \text{ колоний}$$

$$1 \text{ мл} - X \text{ колоний}$$

$$X = (1 \cdot 25) / 0,5 = 50 \text{ бактериальных клеток на } 1 \text{ мл воды.}$$

3. Проведите санитарно-бактериологическую оценку пробы воды в соответствии с данными: если в 1 мл воды содержится от 0 до 100 колоний, то вода считается чистой, от 100 до 1000 – сомнительной, от 1000 и более – загрязненной.

4. Определите количественный и качественный состав микрофлоры воды. Для этого посчитайте число внешне одноклеточных колоний, опишите их культуральные признаки. Из каждой колонии сделайте препарат и окрасьте по Граму.

5. Внесите данные в таблицу 2.

Таблица 2

Многообразие микрофлоры воздуха, воды, почвы

среда	Объект исследования	№	КОФ	Характеристика колоний	H ₂ S	NH ₃	индол	Гр+/-	форма клеток	капсулы	споры	подвижность	вид
вода	Вода из реки Днепр			1. форма									
				2. размер									
				3. поверхность									
				4. край									
				5. прозрачность									
				6. консистенция									
				7. пигмент									
вода	Водопродвиная вода			1. форма									
				2. размер									
				3. поверхность									
				4. край									
				5. прозрачность									
				6. консистенция									
				7. пигмент									
воздух	Лекционный аудитории			1. форма									
				2. размер									
				3. поверхность									
				4. край									
				5. прозрачность									
				6. консистенция									
				7. пигмент									
воздух	Библиотеки			1. форма									
				2. размер									
				3. поверхность									
				4. край									
				5. прозрачность									
				6. консистенция									
				7. пигмент									

Почва	Глина	1. форма								
		2. размер								
		3. поверхность								
		4. край								
		5. прозрачность								
		6. консистенция								
		7. пигмент								
	Горшечного цветка	1. форма								
		2. размер								
		3. поверхность								
		4. край								
		5. прозрачность								
		6. консистенция								
		7. пигмент								

Работа 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

1. Подсчитайте число однотипных колоний, умножьте на разведение и определите количество микроорганизмов в 1 г сырой почвы ($N_c = n \cdot a$).

2. Чтобы сравнивать КОЕ микроорганизмов разных типов почв необходимо пересчитать их число на 1 г абсолютно сухой почвы. Для пересчета на 1 г абсолютно сухой почвы ее высушивают до постоянной массы, устанавливают влажность и вносят поправку в расчеты. Контрольные взвешивания почвы на определение влажности делают каждые три часа до тех пор, пока не будет постоянного веса.

3. Определение числа клеток бактерий в 1 г абсолютно сухой почвы

$$N = ((N_c \cdot 100\%) / (100\% - C\%)),$$

где N – количество клеток бактерий в 1 г абсолютно сухой почвы,

N_c – количество клеток бактерий в 1 г сырой почвы,

$N_c = n \times a$,

n – число колоний, выросших на чашке (среднее арифметическое из всех чашек),

a – степень десятикратного разведения,

$C\%$ – влажность исследуемой почвы (%).

4. Определите количественный и качественный состав микрофлоры воды. Для этого посчитайте число внешне однотипных колоний, опишите их культуральные признаки. Из каждой колонии сделайте препарат и окрасьте по Граму.

5. Внесите данные в таблицу 2.

Работа 4. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

В исследуемом материале содержится более чем один вид микроорганизмов, поэтому на чашках рост различных колоний и при приготовлении мазков с культуральной среды при микроскопировании дает многообразие микрофлоры и трудность идентификации. Поэтому из Ваших культуральных сред по всем объектам исследования приготовьте чистые культуры для последующего анализа.

1. Бактериальную петлю профламбировать, приоткрыть крышку чашки Петри, ввести петлю, дотронуться петлей до крышки (выровнять температуру), взять бакматериал колонии и перенести на новую среду.

2. Варианты пересева: 1. На скошенном МПА в пробирке «змейкой» провести бакпетлей с культурой. 2. Методом истощающего штриха в чашке с МПА.

3. Чашки вверх дном поставить в термостат на 2–3 суток.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 5

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель: ознакомиться с видами культур, методами посева, поддержания и изучения культуральных свойств.

Задачи:

1. Освоить методику описания и определения культуральных свойств микроорганизмов.
2. Ознакомиться с определителем микроорганизмов и освоить правила работы с ним.
3. Определить микроорганизмы из чистых культур проб воздуха, воды и почвы.

Методические указания

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют **культивированием** (от лат. *cultus* – выращивание), а развившиеся в результате микроорганизмы – **культурой**. При развитии в жидкой среде культуры образуют *суспензию*, *осадок* или *пленку*, при развитии на плотной среде – *колонию*. Культура может быть **чистой** – содержать потомство клетки только одного вида и **накопительной** – состоять преимущественно из клеток одного вида микроорганизмов. **Вид** – это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходное строение и физиологические функции. Культуры микробов одного вида, выделенные из разных источников, называют *штаммами*. Некоторые культуры микробов одного вида могут отличаться друг от друга по одному или нескольким признакам. Такие культуры называют в микробиологии *типами* или *биотипами*. Типы микробов могут различаться, например, по биохимическим признакам, чаще всего по активности ферментов (биохимические или ферментативные типы), по чувствительности к антибиотикам (стрептомициноустойчивый тип), по чувствительности к специфическим фагам (фаготип), по антигенным признакам (серотип) и т. д. **Клон** (или клонированная культура) – это культура микробов одного вида или штамма, содержащая генетически однородные клетки. Клоны получают в результате размножения одной клетки, изолированной с помощью микроманипулятора или другими методами. Видимое невооруженным глазом изолированное скопление микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной или нескольких клеток, называют *колонией*.

Внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (образца почвы, пробы воды) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называют **посевом**. Перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую (стерильную) называют **пересевом**, или **пассированием** (от лат. *passus* – чередование).

Обычно микроорганизмы выращивают при определенной постоянной температуре в *термостатах* или *термостатных комнатах*. В тех и других постоянная температура поддерживается с помощью терморегуляторов.

Культивирование при определенной температуре называется **инкубацией**, или **инкубированием** (от лат. *incubatio* – выращивание, высиживание птенцов). Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде: пробирках, колбах или чашках Петри. Для этого стеклянную посуду, не бывшую в употреблении, очищают от щелочи кипячением в растворе, содержащем $K_2Cr_2O_7$ (6%) и концентрированную H_2SO_4 (6%). После стерилизации пробирки с еще не застывшей средой раскладывают на ровной поверхности стола в наклонном (под небольшим углом) положении для получения скошенной поверхности агара. Это так называемые **косяки** – косые или скошенные среды.

Плотная среда, застывшая при вертикальном положении пробирки, называется **столбиком**. Столбики питательной среды, занимающей 1/3–1/2 объема пробирки, используют для посева культуры *уколом*. Столбики питательной среды, занимающие 2/3 объема пробирки, после стерилизации применяют для заливки стерильных чашек Петри, предназначенных для микробиологических посевов.

Накопительные культуры. Путем многократных пересевов в такую же жидкую среду и посева на твердую среду того же состава можно без труда выделить преобладающий (накопленный) штамм. Частый пересев с жидкой среды на жидкую предотвращает рост сопутствующих организмов, которые могли бы использовать продукты выделения или даже автолиза клеток первичной культуры. Лучшим материалом для инокуляции служат пробы из тех мест, где уже имеется «естественное обогащение». Можно, например, выделять микроорганизмы, использующие окись углерода, из сточных вод газовых заводов; использующие гемоглобин – из сточных вод боен, а те, которые окисляют углеводороды, – из почвы на нефтепромыслах или из нефтяных отстойников. Для успешного получения накопительных культур следует ограничиться удовлетворением минимальных потребностей только того микроорганизма, который хотят выделить. Для подавления роста грам-положительных бактерий к питательной среде добавляют пенициллин. Рост мицелиальных грибов, дрожжей, простейших и других эукариот ингибируют добавлением циклогексимида.

Чистая культура. Под чистой культурой понимают потомство одной единственной клетки (клон). Процедура начинается с отделения от точной популяции одной единственной клетки, причем вырастающая из клетки колония тоже должна оставаться изолированной от других клеток и колоний. Аэробные бактерии выделяют по методу Коха – рассеивают суспензию по поверхности среды в чашках Петри или применяют менее трудоемкий метод – размазывают каплю бактериальной петлей по агаризованной среде. Анаэробные бактерии суспензируют в расплавленном агаре (45°C) и проводят инкубацию без доступа воздуха. Тщательное отделение одной колонии, повторное суспендирование в жидкой среде и повторное нанесение штриха или разведение в агаре позволяют получать чистые культуры большинства микроорганизмов. Можно выделять чистую культуру и в жидких средах, если искомые организмы численно преобладают в исходном материале. Путем последовательного разбавления суспензии питательной средой можно в конце концов добиться того, чтобы на последней ступени разведения была выделена лишь одна клетка. В этом случае будет получен клон, т. е. чистая культура.

Смешанные культуры. Естественные популяции, как правило, представляют собой смесь различных микроорганизмов. Между ними существуют самые различные формы взаимодействия; это может быть конкуренция за общий субстрат, комменсализм или мутуализм. Для изучения этих и других форм взаимодействия все чаще используют смешанные культуры. Смешанные культуры могут быть приготовлены путем объединения чистых культур. Исследования, проводимые на смешанных культурах заданного состава, дают возможность понять, какими могут быть сложные формы взаимодействия микроорганизмов в местах их естественного обитания. Примерами могут служить кислое тесто, кефир, чайный гриб и «чистые расы» дрожжей. Большую роль смешанные культуры играют также при очистке сточных вод.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР. Из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии и при микроскопировании выявляются похожие клетки, в частности по размеру и окраске по Граму. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться кокковидные клетки, цисты и споры.

1. Посев штрихом или разливом на твердую среду. Методы посева на плотные среды в чашках зависят от необходимости вырастить микроорганизмы в толще среды или на ее поверхности:

а) для глубинного посева используют мерные количества плотной среды, заготовленные в пробирках по 10–15 мл. Культуру вносят в пробирки с расплавленным и охлажденным до 40–45°C агаром, а затем заливают смесь в чашку Петри. Другой способ глубинного посева: взвесь микроорганизмов вносят непосредственно в стерильную чашку Петри на дно, слегка приоткрыв крышку, а затем заливают ее расплавленным и охлажденным агаром. Среду с культурой перемешивают круговыми движениями чашки, не поднимая ее с поверхности стола, и оставляют чашку на столе до застывания агара;

б) для поверхностного роста исследуемый материал наносят на поверхность уже застывшей среды. Распределение материала по пластинке агара можно выполнить с помощью шпателя или бактериологической петли. При посеве шпателем чашка с застывшей средой находится на поверхности стола.левой рукой слегка приоткрывают крышку, а правой вносят на поверхность агара определенное количество (петлю, каплю или определенный объем) культуры. Круговыми движениями шпателя распределяют культуру по всей поверхности среды. При использовании для посева бактериологической петли осуществляют посев штриховым способом. Чашку Петри кладут на стол дном кверху и левой рукой поднимают только ее основание со средой; держат дно чашки в руке вертикально и осторожно, не взрыхляя среды, наносит культуру петлей зигзагообразными движениями (штрихом). Много методов посева штрихом в чашки с твердыми средами («штрихованные чашки»), но лишь один из них почти всегда дает хорошо изолированные колонии даже при отсутствии навыков у экспериментатора. Для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Т, разделяющую дно на 3 сектора. Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности агара в секторе 1. Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают. Петлю стерилизуют в пламени и дают ей остыть 15 с. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 1, затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 2. Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 2 и затем наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 3. Инкубируют опрокинутые вверх дном чашки для того, чтобы конденсирующаяся вода с крышки не попала на поверхность агара. В секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторах 2 и 3 появляются изолированные колонии.

При работе с анаэробами «штрихованные чашки» или чашки с внесенной в них жидкой культурой в атмосфере воздуха инкубируют затем в

анаэробостате. Для анаэробов необходимы свежеприготовленные среды, и посев штрихом следует проводить в течение первых 4 ч после их автоклавирования, чтобы избежать накопления растворенного кислорода.

2. Последовательные разведения в твердой среде. Способ посева с помощью разлива по чашкам заключается в том, что после инокуляции испытуемой пробы в пробирку со стерильным расплавленным агаром (охлажденным до 45–50°C) среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают ей застыть. Однако, чтобы получить хорошо изолированные колонии, часто возникает необходимость разведения проб. Наилучшие результаты получают при использовании последовательных десятикратных разведений исходных проб. По 1 мл каждого разведения вносят в чашки Петри, добавляют 15–20 мл расплавленной агаровой среды, смешивают, покачивая чашки несколько раз, и дают среде затвердеть.

Недостатком разведения в расплавленной агаровой среде является то, что отдельные колонии оказываются погруженными в агар и поэтому извлечь их можно только механически стерильным инструментом. Плохо также то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара (45–50°C).

Для выделения анаэробов, особенно фототрофов и сульфатредуцирующих бактерий, часто используют метод глубинного посева со встряхиванием пробирок. Для этого готовят серию стерильных пробирок, помещают их в водяную баню при 45°C и наполняют до половины расплавленной агаровой средой той же температуры. Инокулируют первую из пробирок несколькими каплями смешанной культуры и осторожно размешивают со средой. Затем 1/10 объема среды переносят во вторую пробирку. В это время нижнюю часть первой пробирки погружают в вертикальном положении в холодную воду для затвердения агара. Размешивают содержимое второй пробирки и переносят 1/10 объема ее среды в третью пробирку, а вторую пробирку охлаждают. Таким же образом поступают с оставшимися пробирками. После этого в каждую пробирку с затвердевшим агаром наносят сантиметровой слой расплавленной стерильной смеси (1 : 1) парафина и вазелинового масла, благодаря чему среда предохраняется от контакта с воздухом. В процессе затвердения парафиновый слой может сжиматься, и тогда он перестает выполнять свою защитную функцию. В этом случае следует применить слабое локальное нагревание, а также проколом удалить воздушные пузырьки из-под парафинового покрытия. Когда бактерии вырастают, выбирают пробирку с хорошо изолированными колониями и удаляют из нее столбик агара. Для этого вначале расплавляют и снимают парафиновый слой, а затем вводят между стенкой пробирки и агаром

стерильную капиллярную пипетку. Кончик пипетки опускают до дна пробирки и вдуванием воздуха выталкивают агаровый столбик из пробирки в стерильную чашку. Чтобы получить колонии, агар разрезают на кусочки.

Метод *фракционированного посева*. Агар, находящийся в пробирках, предварительно расплавляют на кипящей водяной бане, а среду с желатином – при 30–35°C. Питательные среды с соблюдением асептики разливают в чашки Петри. Для этого пробирку с расплавленной средой, охлажденной до 45°C, берут в правую руку, держат в наклонном положении, вынимают пробку, обжигают края пробирки, левой рукой осторожно, не прикасаясь к нижнему ранту, приподнимают один край крышки чашки Петри, выливают содержимое в чашку и сразу же ее закрывают и подсушивают. Для подсушивания агара чашки помещают открытыми (дном вверх) в термостат на 2–3 ч или закрывают на 24 ч. Каплю исследуемого материала, содержащего смесь микробов, вносят в первую чашку и стерильной петлей или шпателем растирают по поверхности агара в первой чашке, приоткрывая крышку лишь настолько, чтобы могла пройти петля или шпатель. После этого, не обжигая, шпатель быстро переносят во вторую чашку, втирают оставшийся на нем материал в поверхность агара этой, а затем и третьей чашки. Таким образом, постепенно уменьшая количество высеваемого материала на шпателе, в последней чашке можно получить отдельные колонии каждого вида микробов, содержащихся в смеси. На крышках чашек отмечают номер чашки, дату и место, откуда взят материал, затем чашки помещают в термостат *вверх* дном.

3. Посев уколом в столбик питательной среды. Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку. Над пламенем вынимают пробку и переворачивают пробирку вверх дном. Петлю с исследуемым материалом вкалывают снизу в центр столбика на всю его глубину, затем петлю извлекают, пробирку закрывают, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

При посеве уколом в столбик желатины рост может быть только по уколу (стержень) или с образованием боковых выростов от линии укола в виде ершика, елочки, перевернутой вершиной вниз, и т. д. Кроме того, при росте на желатине отмечают степень ее разжижения протеолитическими ферментами микробов. При отсутствии у микроба протеолитического фермента желатина остается плотной. Наличие у микроба протеолитических ферментов определяется различной степенью разжижения желатины (полное разжижение, послойное, в виде воронки).

При посеве пастеровской пипеткой поверхность ее обжигают на пламени спиртовки, охлаждают, отнеся в сторону от огня, затем обломав сте-

рильным пинцетом запаянный конец, набирают в нее материал, быстро вносят в пробирку и производят посев так же, как это делают петлей, соблюдая правила стерильности. После использования пипетки ее помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью (5%-ным раствором карболовой кислоты или др.).

4. Последовательное разведение в жидкой среде. Этот метод применяют в том случае, если выделяемый микроорганизм не растет на твердой среде. При этом данный микроорганизм должен количественно преобладать в смешанной популяции. Готовят раствор смешанной культуры таким образом, чтобы при добавлении аликвот в большое число пробирок с питательной средой среднее число инокулированных бактерий было бы менее 0,05 на пробирку. Это достигается, например, при инокуляции 1-миллилитровых аликвот в 100 пробирок из 100 мл раствора, содержащего всего 5 бактерий. При инкубации в большинстве пробирок роста бактерий не происходит, но в те несколько пробирок, где наблюдается рост, вероятно, попала лишь одна бактерия ($P = 0,975$). Чем меньше среднее число бактерий, инокулированных в пробирку, тем больше вероятность того, что культура выросла из единственной бактериальной клетки. Следовательно, в большинстве инокулированных пробирок роста быть не должно, тогда в тех нескольких пробирках, где рост наблюдается, вероятность инокулирования среды единственной клеткой очень высока.

Метод пластинчатых разводов. Берут несколько пробирок с расплавленным и остуженным до 60°C мясopептонным агаром и стерильные чашки Петри. Для того чтобы расплавленный агар не застыл, во время опыта его оставляют на бане при 50°C . Бактериологической петлей, соблюдая условия стерильности, в первую пробирку с агаром вносят каплю исследуемого материала и, закрыв пробку, энергично вращают пробирку между ладонями (так, чтобы не замочить пробку!) для равномерного распределения материала в среде. Пробирку помечают № 1. Берут вторую пробирку со стерильным незасеянным агаром и, держа обе пробирки в левой руке, переносят одну каплю из пробирки № 1 во вторую. Пробирки закрывают, петлю прокалывают, пробирку № 1 помещают в теплую воду, а содержимое пробирки № 2 перемешивают, вращая между ладонями. Затем одну каплю из засеянного агара из пробирки № 2 переносят в третью пробирку со стерильным агаром и т. д., получая последовательные разведения материала. Чем больше загрязнен материал, тем больше готовят разведений.

Приготовив разведения, засеянный агар из каждой пробирки выливают в стерильную чашку Петри. Для этого вынимают пробку из пробирки и после обжигания края пробирки быстро выливают агар в чашку со слегка

подогретым на пламени спиртовки дном, приподнимая крышку чашки настолько, чтобы прошел край пробирки. Легким покачиванием чашки агар равномерно распределяют по дну и дают ему застыть. На дне чашки отмечают разведение и дату опыта и ставят чашку в термостат вверх дном. Выросшие отдельные колонии в дальнейшем отсевают в стерильную питательную среду (в пробирки) для получения чистых культур. При исследовании молока, воды, почвы и других субстратов, содержащих огромные количества микроорганизмов, по методу пластинчатых разводов удобно готовить предварительные разведения материала на стерильной водопроводной воде или 0,85%-ном физиологическом растворе NaCl.

5. Выделение отдельных клеток. Капельный метод выделения чистой культуры из одной клетки. Этот метод используется, когда требуется изолировать крупные микроорганизмы (дрожжи, плесневые грибы). На солодовом сусле готовят взвесь микробов с таким расчетом, чтобы при микроскопировании в капле жидкости можно было обнаружить одну клетку.

Чистое покровное и предметное стекло с лункой стерилизуют на пламени горелки, а для охлаждения помещают в стерильную чашку Петри. Для переноса микробов используют тонкое чертежное перо, простерилизованное на пламени горелки. Простерилизованным пинцетом вынимают покровное стекло, берут его между большим и указательным пальцами левой руки и пером наносят по диагонали 3 ряда капель по 4 в каждом ряду (капли не должны расплываться по стеклу). Затем края покровного стекла осторожно смазывают стерильным вазелином, что предохраняет капли от высыхания. Покровное стекло накладывают каплями вниз на предметное стекло по диагонали. Ряды капель должны быть параллельны сторонам предметного стекла. Каждую каплю просматривают отдельно, сначала при малом, а затем при большом увеличении. Капли с одной клеткой отмечают точкой тушью. После чего препарат переносят в чашку Петри, на дне которой должна находиться фильтровальная бумага, пропитанная стерильной водой и предохраняющая капли от высыхания. Чашку помещают в термостат при температуре 30–36°C. По истечении 24–48 ч снова микроскопируют. Если в отмеченных каплях произошло размножение клеток, производят пересев в жидкую среду. Осторожно снимают покровное стекло. Простерилизованным пинцетом берут маленький стерильный треугольник фильтровальной бумаги, прикасаются к намеченной капле и немедленно переносят в пробирку со стерильной питательной средой. Выращивают в термостатах при температуре 26–30°C.

Выделение чистых культур из одной клетки (метод Бурри). Тушь, разбавленную дистиллированной водой в отношении 1:6, стерилизуют в

автоклаве при 111°C в течение 30 мин. и тщательно центрифугируют или дают отстояться не менее 14 дней. Четыре крупные капли туши наносят на стерильное чистое предметное стекло и бактериологической петлей вносят незначительное количество исследуемой культуры в первую каплю, перемешивают и часть ее переносят во вторую каплю и т. д. Из последней капли тонким стерильным чертежным пером наносят несколько последовательных точек на поверхность мясоептонного агара или мясоептонного желатина в чашке Петри. Затем каждую точку покрывает стерильным покровным стеклом и микроскопируют. Находят точку, содержащую в себе одну микробную клетку, стерильным пинцетом снимают покровное стекло с приставшим к нему микробом и переносят его в пробирку с соответствующей питательной средой. Поместив пробирку при оптимальной температуре, получают культуру микробов из одной клетки.

ИЗУЧЕНИЕ КОЛОНИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ.

При определении культуральных свойств бактерий учитывается характер их роста на жидких средах и в желатине по уколу.

Рост на жидкой питательной среде может быть:

а) поверхностный – пристеночное кольцо, тонкая, нежная или плотная, сухая, толстая, грубая, морщинистая пленка;

б) пристеночный – среда прозрачная, а на стенках сосуда образуются различные наложения (колонии) в виде хлопьев, зерен или нитей;

в) придонный – питательная среда прозрачная, а на дне пробирки образуется осадок. Осадок может быть скудным или обильным, гомогенным, крошковатым, зернистым, волокнистым;

г) с равномерным помутнением среды.

При описании роста микробов на МПБ обращают внимание на:

1) характер помутнения среды: легкое, среднее, сильное или отсутствие мути;

2) образование пленки на поверхности среды: тонкая, толстая, морщинистая, складчатая, слизистая и т. д.;

3) количество, характер и цвет осадка: точечный, обильный, зернистый, слизистый, хлопьевидный, серый, бело-желтый и т. д.;

4) наличие пристеночного кольца: узкое, широкое, тонкое, узловатое, серое, синеватое. Для анаэробов отмечают еще и газообразование.

Рост на плотных средах. Рост на плотных средах может иметь вид сплошного наложения или отдельных колоний и быть обильным, слабым или умеренным. Т.к. колония образуется в результате размножения одной клетки, ее строение зависит от особенностей деления клеток данного вида микроорганизмов. Каждый вид микробов образует на плотных питатель-

ных средах колонии, обладающие определенными свойствами. Эти свойства колоний изучают макроскопически и микроскопически. При макроскопическом изучении колоний (невооруженным глазом) чашку просматривают сначала со стороны дна в проходящем свете, а затем со стороны крышки в отраженном свете. При микроскопическом изучении выявляется строение колоний – характер их краев и структура. Край колонии может быть ровным в виде четко выраженной линии и неровным (фестончатый, волнистый, зубчатый, бахромчатый, локонообразный). Структура колоний может быть гомогенная или аморфная, мелко- и грубозернистая, волокнистая, однородная и неоднородная. Различают поверхностные и глубинные колонии в зависимости от их положения в среде. Наиболее типично видовые признаки выражены у поверхностных колоний. Форму, профиль, блеск и цвет отмечают визуально, край и структуру – при малом увеличении микроскопа, консистенцию (мягкая, слизистая, тягучая или хрупкая) определяют прикосновением к ее поверхности петлей, размеры – обычной линейкой или окулярным микрометром при малом увеличении микроскопа (колонии точечные – менее 1 мм в диаметре, мелкие – 1–2, крупные – более 4 мм).

Характер роста по уколу. Характер роста по уколу указывает на отношение микроба к кислороду воздуха, аэробы растут в виде гвоздя, шляпкой вверх, факультативные анаэробы растут равномерно по всему уколу; анаэробы – в нижней части укола. При выращивании на МПЖ одни виды бактерий (протеолитические) разжижают желатин, другие – не разжижают.

Лабораторный практикум

Работа 1. ОПИСАНИЕ КОЛОНИЙ НА ПЛОТНЫХ СРЕДАХ

Чашки с посевами, сделанными на предыдущих занятиях, просматривать в проходящем свете и под бинокулярной лупой. Для каждого типа колоний из микробной смеси на плотной среде в чашке Петри дать описание по следующей схеме:

1. Форма – круглая, овальная, ветвистая и т.д.
2. Размеры – крупные (более 4 мм), средние (2–4 мм), мелкие (1–2 мм), точечные или росинчатые колонии диаметром не более 1 мм.
3. Поверхность – ровная или складчатая (радиально складчатая, поперечно-складчатая, ноздреватая, с кратерообразным центром, мозговидная), матовая или блестящая и т.д.
4. Края – ровные, разорванные, ветвистые, волнистые, изрезанные, локонообразные, лопастные и т.д.

5. Прозрачность – степень прозрачности или непрозрачности.
6. Консистенция – слизистая, крошковатая, плотная и т.д.
7. Пигментированность – красный, желтый, черный, синий и т.д.

Работа 2. ПОСТАНОВКА КУЛЬТУРЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. В пробирки с 30 мл МПБ профлампированной бакпетлей внести культивируемый материал чистой культуры, полученной в предыдущей работе.

2. Между пробкой и стенкой пробирки подвесить полоски бумаги:

- розовую лакмусовую, смоченную дистиллированной водой – на наличие аммиака,
- фильтровальную, смоченную раствором уксуснокислого свинца (66 г уксуснокислого свинца + 100 мл дистиллированной воды) – на наличие сероводорода,
- фильтровальную, смоченную насыщенным (12%) раствором щавелевой кислоты – на наличие индола.

Полоски фильтровальной бумаги для обнаружения сероводорода и индола заготовлены заранее, взять их из банки с притертой крышкой.

3. Пробки пробирок сверху покрыть пергаментной бумагой, перетянуть резинкой или обвязать нитками, поставить в термостат на 2-3 суток. Максимальное накопление продуктов жизнедеятельности происходит в течение недели.

При наличии аммиака розовая лакмусовая бумага синееет, при наличии сероводорода бумага с уксуснокислым свинцом чернеет, при наличии индола бумага с раствором щавелевой кислоты розовеет.

Работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДА МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Приготовить мазки:

- по Граму (определение формы клеток и грампринадлежности),
- на капсулы,
- на споры,
- если палочковидные – на подвижность (препарат висючая капля, окрашивание на жгутики).

2. Определить вид микроорганизмов по определителю Д.Берги.

3. Заполнить отчетную таблицу 2 предыдущего лабораторного занятия.

Работа 4. ПОДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМА № 6

1. В стерильные чашки Петри залить по 15–10 мл расплавленного мясо-пептонного агара, дать застыть.

2. Внести культуры бактерии воздуха, шпателем Дригальского равномерно засеять культуру микроорганизмов.

3. Чашку вверх дном поместить в термостат на 15–20 мин. для подсушивания.

4. Дыроколом пробить фильтровальную бумагу и диски напитать соками растений (чеснок, лук, алоэ, каланхое – мелко нарезать, в ступке растереть, пропитать диски).

5. Дно чашки маркером разделить на сектора, промаркировать.

6. Пинцетом разложить бумажные диски, пропитанные растительными экстрактами, на газон микроорганизмов в чашках Петри по периметру.

7. Обожженным пинцетом разложить диски, пропитанные антибиотиками и дезинфицирующими средствами в общепринятых концентрациях.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 6

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель: изучить влияние бактерицидных и бактериостатических веществ на рост микроорганизмов.

Задачи:

1. Изучить влияние природных материалов, антибиотиков, дезинфицирующих веществ на рост микроорганизмов.

Методические указания

Существует несколько методов определения чувствительности микроорганизмов к природным веществам с бактериоцидным и бактериостатическим действием, антибиотикам. Наибольшее распространение получил метод серийных разведений антибиотика в жидкой или агаризованной питательной среде и метод бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков. Определение чувствительности к антибиотикам основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Концентрация антибиотиков в дисках подобрана таким образом, чтобы диаметры зон задержки роста стандартных тест-организмов были 28–32 мм.

Бактерии исследуемого штамма (0,1 мл суспензии, находящейся в стационарной стадии роста) высевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри и распределяют шпателем. Затем стерильным пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков, выпускаемые промышленностью. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста исследуемых бактерий. Если бактерии чувствительны к данному соединению, то вокруг дисков образуется зона задержки роста. Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику.

Метод серийных разведений антибиотика в жидкой питательной среде позволяет путем определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика количественно охарактеризовать его активность в отношении исследуемых микроорганизмов.

Работу начинают с приготовления растворов антибиотика. Для этого в ряд стерильных пробирок наливают по 2 мл жидкой полноценной питательной среды. В первую пробирку вносят 2 мл исходного раствора анти-

биотика (концентрация препарата – 500, 1000 мкг/мл) и тщательно перемешивают смесь. После этого 2 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую, повторяя перемешивание, далее 2 мл из второй пробирки переносят в третью и т. д. Из предпоследней пробирки 2 мл раствора антибиотика удаляют. При таком способе разведения в каждой пробирке будет содержаться по 2 мл раствора антибиотика и в каждой последующей пробирке его концентрация будет в два раза меньше, чем в предыдущей. Среда в последней пробирке раствора антибиотика не содержит и является контрольной для роста культуры. После приготовления разведений во все пробирки вносят по 0,1 мл взвеси клеток с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^5 – 10^4 клеток. Пробирки энергично перемешивают и помещают на 18–20 часов для выращивания при оптимальной температуре. Учет результатов проводят двояко: вначале просматривают пробирки, чтобы по помутнению среды определить наличие роста микроорганизмов. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более 10^7 клеток/мл). Среда в пробирках, в которых антибиотик находится в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной. Наименьшая концентрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое пробирок остается прозрачным, соответствует наименьшей ингибирующей концентрации данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма и рассматривается как бактериостатическая, что означает задержку роста бактерий, но не наличие их гибели. Для определения бактерицидной концентрации исследуемого антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма (это значит, концентрации препарата, в которой он вызывает гибель клеток) проводят посев бактериологической петлей из пробирок, содержимое которых не помутнело, на полноценную питательную агаризованную среду. Отсутствие роста свидетельствует, что в данной пробирке микроорганизмы полностью убиты данным антибиотиком. Метод серийных разведений антибиотика в агаризованной среде удобен тем, что позволяет в одном опыте проверить чувствительность к данному антибиотику нескольких микроорганизмов. Разведения антибиотика готовят в стерильной агаризованной среде. Для этого в нее добавляют требуемое количество исходного раствора антибиотика, тщательно перемешивают и заливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара дно чашки с наружной стороны делят маркером на сектора. Каждую исследуемую культуру засевают штрихом с помощью бактериологической петли на отдельный сектор в чашки с разными концентрациями антибиотика. Чашки помещают в термостат при температуре, оптимальной для

роста и развития изучаемых бактерий и инкубируют в течение 40–72 часов. Результаты учитывают по наличию или отсутствию роста бактерий в сравнении с ростом на среде в контрольной чашке. Бактерии считаются чувствительными к антибиотику в такой его концентрации, при которой их рост полностью подавляется.

Лабораторный практикум

Работа 1. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Достать из термостата чашки Петри, сравнить количество и размеры колоний в опытном и контрольном вариантах. Если испытуемое вещество обладает сильным бактерицидным действием, то в непосредственной близости от нанесенного диска веществом бактерицидного спектра действия рост бактерий не происходит и образуется стерильная зона. На некотором удалении располагается зона угнетения роста, для которой характерен рассеянный рост колоний. При подведении итогов замеряют плоской миллиметровой бумаги размер (радиус) стерильной зоны и размер (радиус) зоны угнетения, данные заносят в сводную таблицу.

Влияние бактерицидных веществ на рост микроорганизмов

Исследуемое вещество	Размер зоны "угнетения" – бактерицидности, мм	Размер зоны отсутствия роста – бактериостатичности, мм
1.		

Работа 2. ПОДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМА № 7

2.1. Брожение пектиновых веществ.

1. Подготовить снопики из сухой льняной соломки (высотой 6–8 см и толщиной соразмерно с диаметром пробирки), перевязать их в двух местах нитками и кипятить 3–5 мин. для удаления экстрактивных (легко-ображивающихся) веществ.

2. Поместить снопики в высокие пробирки, залить на 2/3 их объема водой, закрыть ватными пробками и прогреть в кипящей водяной бане 3 мин. Вода при этом становится желто-зеленого цвета.

3. Затем пробирки охладить под краном и в снопик вводят свежий стебель льняной соломки для заражения. Пробирки вновь закрывают ватными пробками, оборачивают их бумагой, подписывают и помещают в термостат при температуре 28–30°C.

2.2. Брожение клетчатки.

Для получения накопительной культуры анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий пользуются питательной средой Омелянского следующего состава: $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ – 1,0 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 0,1 г, CaCO_3 – 2,0 г, FeSO_4 – 2 капли 1%-ного раствора, пептон – 0,6 г, вода водопроводная – 1000 мл. После приготовления среду стерилизуют в автоклаве.

1. Среду разлить в колбы па 2/3 объема.

2. Добавить 0,5–1 г почвы и кипятить колбы со средой и почвой 5 мин. для уничтожения неспорных форм.

3. Внести в колбу несколько полосок фильтровальной бумаги.

4. Долить доверху питательную среду и закрыть колбу пробкой с затвором для выхода газов. Помещают в термостат при температуре 30–35°C.

2.3. Аэробное разложение клетчатки.

1. На дно чашки Петри положить кружок фильтровальной бумаги, сверху заполняют почвой слоем около 1 см, предварительно увлажненной водой или средой Гетчинсона следующего состава, г: NaNO_3 – 2,5, K_2HPO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,3, CaCl_2 – 0,1, NaCl – 0,1, FeCl_3 – 0,01, вода дистиллированная – 1000 мл.

2. Поверхность почвы выравнять шпателем, сверху положить кружок фильтровальной бумаги, плотно прижать к поверхности среды, чашки помещают в термостат при 27–30°C.

3. Периодически смачивают почву в чашке водой, но не допускают того, чтобы вода полностью заливала фильтровальную бумагу и не развились бы на верхнем кружке фильтровальной бумаги анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии.

2.4. Окисление микроорганизмами жира.

1. Приготовить среду Рана: K_2HPO_4 – 5 г, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ – 5 г, CaCl_2 – 1 г, MgSO_4 – 1 г, NaCl – следы, FeCl_3 – следы, вода дистиллированная – 1000 мл.

2. Среду по 30 мл налить в колбы на 100–150 мл и заразить 1/3 чайной ложки почвы.

3. Внести 1 мл касторового (или подсолнечного) масла.

4. Поместить в термостат при 25–30°C.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 7

РАЗЛОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ

Цель: Изучить роль микроорганизмов в разложении веществ в природе и биохимическую деятельность основных групп микробов.

Задачи:

1. Изучить брожение пектиновых веществ льняной соломки.
2. Изучить анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии.
3. Изучить аэробные целлюлозоразлагающие бактерии.
4. Микроорганизменное окисление жира в почве.

Методические указания

Брожение пектиновых веществ. Пектиновые вещества – это межклеточные вещества растительных тканей, склеивающие волокна. Пектиновые (греч. *pektos* – свернувшийся, замерзший) вещества входят в состав первичных клеточных стенок и межклеточного вещества (срединных пластинок) растительных тканей. У технических культур (лен, конопля, кенаф, джут, канатник и др.) лубяные волокна соединены с кострой и паренхимой при помощи пектиновых веществ. Много пектина в плодах, ягодах, стеблях, корнеплодах. Свойство пектина (и его растворов) – образовывать гели или студни – позволяет использовать его как естественный желирующий субстрат в пищевой промышленности, в кондитерском производстве. В качестве сырья для получения пектина служат яблочные выжимки, кора цитрусовых плодов, жом сахарной свеклы, корзинки подсолнуха и др. В процессе расщепления пектина пектолитическими ферментами межклеточное вещество растительных тканей распадается. Пектиновые вещества являются сложными полисахаридами. Имеются три типа пектиновых веществ: 1) протопектин – водонерастворимая часть клеточной стенки; 2) пектин – водорастворимый полимер галактуруновой кислоты, содержащий метилэфирные связи; 3) пектиновая кислота – водорастворимый полимер галактуруновой кислоты, свободный от метилэфирных связей. Пектиновые вещества разлагаются микроорганизмами. Этот процесс происходит в две фазы. Первая фаза – гидролиз пектиновых веществ до моносахаров под действием экзоферментов, выделяемых микроорганизмами. Фермент протопектиназа разлагает протопектин до растворимого пектина. Фермент пектаза гидролизует метилэфирные связи пектина до пектиновой кислоты и метилового спирта. Затем фермент пектиназа разрывает связи

между единицами галактурановой кислоты, вызывая гидролиз пектиновой кислоты

Вторая фаза – в анаэробных условиях это маслянокислое брожение продуктов распада пектиновой кислоты (галактозы, арабинозы, ксилозы). В природе в анаэробных условиях происходит водяная мочка льна. Брожение пектиновых веществ осуществляют бациллы мочки льна. Так как брожение пектиновых веществ сводится к маслянокислому брожению, неприятный запах масляной кислоты легко улавливается. К бациллам мочки льна, вызывающим анаэробное разложение пектиновых веществ, относятся *Clostridium pectinovorum* и *Clostridium felsineum*. Маслянокислые, грамположительные. Это подвижные палочки размером 10–15 мкм, со спорой, расположенной плектридиально (терминально), – спора у бацилл мочки льна находится на конце клетки, и они имеют вид ракетки или барабанной палочки. Содержат гранулезу. *Clostridium pectinovorum* представляют собой крупные палочки с длинной вегетативной частью. *Clostridium felsineum* – палочки меньшего размера с более короткой вегетативной частью, эти бактерии более кислотоустойчивы. В процессе водяной мочки льна они сменяют предыдущие бактерии, поэтому встречаются чаще в перекиших пробирках. Бациллы мочки льна – облигатные анаэробы. Сбраживают пектин, глюкозу, арабинозу, крахмал, но не сбраживают клетчатку. По отношению к источнику азота малотребовательны, способны усваивать любые его формы.

Разложение микроорганизмами клетчатки. Клетчатка, или целлюлоза, представляет собой сложный полисахарид ($C_6H_{10}O_5)_n$, входящий в состав оболочек растительных клеток. Растения на 40–70% состоят из клетчатки. На долю этого вещества приходится более 50% всего органического вещества биосферы. Огромное количество целлюлозы в виде растительных остатков и отходов попадает в почву и водоемы, где разлагается микроорганизмами – бактериями, актиномицетами, микроскопическими грибами. Анаэробные и аэробные целлюлозоразлагающие бактерии находятся в почвах, навозе, компостах, речном иле, сточных водах.

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

Аэробное разложение. Группа аэробных целлюлозоразлагающих микроорганизмов широко распространена в почве. Это бактерии родов цитофага, спороцитофага, очень требовательные к среде и в большом ко-

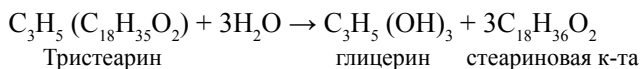
личестве встречающиеся в навозе и почвах, удобренных навозом. Представители рода целлюломонас (*Cellulomonas*) также разрушают целлюлозу. Это грамположительные подвижные палочковидные бактерии, по мере старения их клетки меняют форму и становятся шаровидными. Виды рода целлюломонас разлагают целлюлозу в аэробных условиях. Они распространены в почвах, богатых минеральными формами азота. В разложении целлюлозы участвуют также миксобактерии, актиномицеты и грибы.

Анаэробное разложение. Анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии относятся в основном к роду клостридиум. Эти бактерии обитают в почвах, компостах, навозе, речном иле и сточных водах, распространены в нейтральных и кислых почвах. Типичный представитель рода – клостридиум омелянски (*Clostridium omelianskii*) был выделен в 1902 г. микробиологом В.Л. Омелянским. Клетки этого микроорганизма палочковидной формы (4–8 x 0,3–0,5 мкм), подвижные. У них образуются толстые споры, поэтому спорообразующая клетка сильно раздувается и становится похожей на барабанную палочку. Клостридиум омелянски – мезофил, он разлагает целлюлозу при 30–40°C. В почве, навозе и компостах встречаются также термофильные анаэробные целлюлозоразлагающие бактерии, развивающиеся при температуре 60–70°C. Они активно сбраживают целлюлозу.

В рубце жвачных животных присутствуют специфические целлюлозоразлагающие бактерии. Это облигатные анаэробы, вызывают разрушение целлюлозы кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот спиртов, CO₂ и H₂. Бактерии рубца имеют большое значение в питании жвачных животных.

При разрушении целлюлозы микроорганизмами сначала происходит гидролиз целлюлозы до глюкозы под влиянием ферментов. Конечные продукты аэробного распада целлюлозы – в основном CO₂ и H₂O, анаэробного – этиловый спирт, уксусная, молочная, муравьиная и масляная кислоты, а также CO₂ и H₂.

Окисление жиров и высокомолекулярных кислот жирного ряда. Многие микроорганизмы осуществляют трансформацию жиров и жирных кислот, входящих в состав всех растительных и животных клеток. Начальную стадию расщепления жира – гидролиз – катализирует фермент липаза. Сущность этого процесса может быть показана на примере расщепления тристеарина:



В дальнейшем глицерин и жирные кислоты претерпевают превращения вплоть до полного окисления и образования CO₂ и H₂O. В разложении жи-

ров и жирных кислот принимают участие многие аэробные и анаэробные бактерии и грибы. Наиболее энергично разрушает жиры псевдомонас флуоресценс (*Pseudomonas fluorescens*) – неспорообразующая подвижная палочка, синтезирующая на питательной среде зеленоватый пигмент.

Уксуснокислые бактерии устойчивы к кислотам и способны развиваться при pH 4 (оптимум pH 5...6). Бактерии встречаются на поверхности растений (цветков, плодов), на разлагающихся растительных остатках и т. д. Кроме окисления этилового спирта до уксусной кислоты, уксуснокислые бактерии могут вызывать ряд других окислительных процессов, в частности окисление сорбита до сорбозы, необходимой в больших количествах для синтеза витамина С. Уксуснокислые бактерии используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта. Способ получения уксуса из виноградного вина называют французским, а из разбавленного спирта – немецким.

Лабораторный практикум

Работа 1. БРОЖЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Для изучения брожения пектиновых веществ в лабораторных условиях воспроизводят процесс «водяной мочки» льняных стеблей. Элективные условия для брожения пектиновых веществ создаются за счет следующих факторов: 1) питательная среда – льняные волокна, освобожденные кипячением от экстрактивных веществ: присутствие бацилл мочки льна на стеблях и особенно на сололке, используемой для заражения; 2) анаэробные условия благодаря высокому столбику жидкости в пробирке; 3) устранение после кипячения и пастеризации неспорных форм. Брожение пектиновых веществ заканчивается в пробирках через 6–8 дней. Сноптики всплывают, вытесняемые образовавшимися при брожении газами. Готовят препарат-мазок.

1. Обезжирить предметное стекло.

2. Извлечь снопик из пробирки, положить в чашку Петри, достать из снопика соломинку и, держа ее за концы, «растрепать».

3. Растрепанным участком сделать мазок на предметном стекле, высушить, фиксировать на пламени, окрасить кристаллвиолетом.

4. Микроскопировать в иммерсионной системе. Зарисовать бациллы мочки льна и отметить характер их спорообразования.

5. Отжать каплю жидкости из снопика на предметное стекло, добавить каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом, микроскопировать на х90. В поле зрения видны вегетативные и спорующие палочки, содержащие гранулезу, окрашенную раствором Люголя в темно-синий цвет. Зарисовать микроорганизмы.

Работа 2. БРОЖЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ

Элективные условия для развития целлюлозоразлагающих бактерий создаются:

- 1) за счет источника углерода – клетчатки (фильтровальная бумага);
- 2) внесения целлюлозоразлагающих бактерий с почвой;
- 3) анаэробных условий;
- 4) минеральных элементов и пептона для питания;
- 5) освобождения от неспорных форм при кипячении.

К анаэробным целлюлозоразлагающим бактериям относится открытый В. Л. Омелянским в 1902 г. *Clostridium omelianskii*. Это маслянокислые палочки, грамположительные, представляющие собой тонкие, подвижные палочки с крупной спорой на конце (плектридиальное или терминальное спорообразование), мезофилы – оптимальная температура для развития 30–40°C. К термофильным целлюлозоразлагающим бактериям относится *Clostridium thermocellum* – оптимальная температура роста около 60°C. Целлюлозоразлагающие бактерии облигатные анаэробы.

1. Обезжирить предметное стекло.

2. Со дна колбы (через 2–3 недели после постановки опыта) извлечь со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазать на предметном стекле.

3. Мазок сушить, фиксировать на пламени, окрашивать кристалливиолетом, исследовать с помощью иммерсионной системы микроскопа. Зарисовать спорные формы.

Работа 3. АЭРОБНОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ КЛЕТЧАТКИ

В работе используют метод почвенных пластинок Кристенсена. Через 4–5 суток после постановки опыта на бумаге появляются пигментные зоны и ослизненные участки, указывающие на разрушение клетчатки. Через 1,5–2 недели их микроскопировать. Опыт демонстрирует разницу в скорости разложения клетчатки в аэробных (верхний кружок фильтровальной бумаги) и анаэробных условиях (нижний кружок фильтровальной бумаги на дне чашки Петри под слоем почвы). Возбудителями аэробного разложения клетчатки являются бактерии, актиномицеты, плесневые грибы. Наибольшее значение имеют миксобактерии. К миксобактериям (слизистым) относится цитофага – *Cytophaga* – длинные, слегка изогнутые палочки с заостренными концами. Миксобактерии грамотрицательные, подвижные (передвигаются скольльзящим движением по поверхности), аэробы. Из других аэробных бактерий встречаются вибрионы: *Cellvibrio* –

короткие изогнутые палочки и *Celfalpicula* – короткие толстые палочки с заостренными концами.

1. Бактериологической петлей берут немного слизи, покрывающей фильтровальную бумагу верхнего кружка, растирает ее на предметном стекле.

2. Фиксировать мазок над пламенем, окрасить кристаллвиолетом или фуксином 30–60 с. Препарат рассмотреть, пользуясь иммерсионной системой. Зарисовать миксобактерии и вибрионы в тетради.

Работа 4. ОКИСЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ЖИРА

Жир попадает в почву с растительными, животными и микробными остатками. Микроорганизмы, окисляющие жир, выделяют фермент липазу, который вызывает гидролиз жира до глицерина и жирных кислот. Продукты гидролиза в дальнейшем окисляются до углекислого газа и воды. Окисление жира в почве происходит медленно под действием некоторых бактерий и плесневых грибов. По мере развития жирокисляющих микроорганизмов в прозрачном касторовом масле появляются белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот (на 7–10-е сутки).

Из бактерий наиболее энергично разлагает жиры *Pseudomonas fluorescens* – мелкая, подвижная, неспоровая палочка, образующая на питательной среде зеленоватый пигмент. Реже в среде обнаруживают *Pseudomonas studzeri* (такого же вида) и молочную плесень *Oidium lactis*.

1. С поверхности среды приготовить препарат-мазок.
2. Предметное стекло положить сверху кюветы на стеклянный мостик.
3. Налить смесь Никифорова (несколько минут).
4. Окрасить фуксином (30–60 с).
5. Исследовать с иммерсионной системой, зарисовать.

Работа 5. ПОДГОТОВКА ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМА № 8

5.1. Исследование микрофлоры кожи рук

1. Разлить мясо-пептонный агар в чашки Петри, дать ему застыть.
2. Поставить чашки в термостат вверх дном на 20 мин.
3. На дне чашки маркером разграничить поле чашки на три сектора, промаркировать.
4. Слегка приоткрыть бактериологическую чашку (держат крышкой вниз) и приложить пальцы правой руки к поверхности плотной питательной среды.
5. Затем вымыть руки без мыла и прикоснуться пальцами к поверхности питательной среды второго сектора чашки

6. Тщательно вымыть руки с мылом и прикоснуться пальцами к поверхности агара третьего сектора чашки.

7. Чашки надписать, обозначить дату, завернуть в бумагу и поставить в термостат или у батареи на 2–5 суток соответственно.

5.2. Определение ризосферной микрофлоры методом последовательных отмываний корней по Теппер.

1. Из выкопанных монолитов почвы с растениями стерильным пинцетом и ножницами отобрать 1 г молодых корней примерно одного диаметра с приставшими к ним частицами почвы.

2. Корни поместить в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывать 2 мин.

3. Стерильным крючком из обычной проволочной иглы корни извлечь и перенести последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы.

4. В каждой колбе корни отмывать по 2 мин.

5. Культивирование на *среде Фрейда*: маннит (сахароза или глюкоза) – 10,0 г; KH_2PO_4 – 0,5 г; MgSO_4 – 0,2 г; NaCl – 0,1 г; CaCO_3 – 3,0 г; дрожжевая вода (рН 6,8) – 100 мл; агар – 15 г; дистиллированная вода – 0,9 л или бобовый агар: бобовый отвар – 1000 мл; сахароза – 2 г; KH_2PO_4 – 1,0 г; MgSO_4 – 0,3 г; агар – 15,0 г;

6. Из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой взять по 0,05 мл отмывной воды, нанести на поверхность питательной пластины и каждый раз отдельным шпателем Дригальского, держа полукрытую чашку около пламени горелки, втирать досуха круговыми движениями.

7. Чашки поместить в термостат при 28–30°C.

5.3. Определение почвенных дрожжей, ассоциированных с корневой системой голосеменных методом почвенных комочков.

1. Метод почвенных комочков на среде Эшби. Среда Эшби (г/л дистиллированной воды): манит – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; CaCO_3 – 5,0; агар – 20,0.

2. Навеску 1 г свежей почвы разложить в виде 50 комочков на чашки Петри со средой Эшби, пользуясь для этого трафаретом.

3. Инкубировать в термостате при 25°C. Через 10–15–20 дней вокруг комочков появляется слизь.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ № 8

ТИПЫ БИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МИКРО- И МАКРООРГАНИЗМОВ

Цель: ознакомиться с микробной компонентой макроорганизмов Царств Растения и Животные.

Задачи:

1. Изучение микробной картины поверхностных покровов, полости рта.
2. Изучение микроорганизмов ризосферы и ризоплана растений различных отделов.

Лабораторный практикум

Работа 1. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ КОЖИ РУК

1. Подсчитать однотипные колонии, описать выросшие колонии,
2. Приготовить мазки, окрасить по Граму, зарисовать формы микробов.
3. Заполнить таблицу.

Микрофлора кожи рук

Объект исследования	Колонии		Клетки		
		бактерии	грибы	бактерии	грибы
1. Кожа рук до мытья	Количество Рисунок Форма Профиль Край Структура			Гр +/- Рисунок	
2. Кожа рук после мытья без мыла					
3. Кожа рук после мытья с мылом					

Работа 2. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБОВ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

1. Нанести на предметное стекло каплю стерильного физиологического раствора или стерильной воды.
2. С помощью обожженной спички ваять соскоб зубного налета (у самых десен) или из полости кариозного зуба и смещать его с жидкостью.
3. Покрывать приготовленную каплю покровным стеклом и рассмотреть под иммерсионным объективом микроскопа. Провести наблюдение за подвижностью микроорганизмов, определить направление их движения.
4. Приготовить препарат-мазок, окрасить его по Граму и изучить под иммерсионным объективом. Зарисовать формы микробов.

Работа 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ
МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ОТМЫВАНИЙ КОРНЕЙ
ПО ТЕППЕР

1. Описать одноклеточные колонии, подсчитать КОЕ.
2. Сделать мазки по Граму. Палочковидные бактерии окрасить на споры, сделать мазки «висячая капля» на движение.

Работа 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С КОРНЕВОЙ СИСТЕМОЙ
ГОЛОСЕМЕННЫХ МЕТОДОМ ПОЧВЕННЫХ КОМОЧКОВ

1. Дрожжевые колонии появляются вокруг комочков почвы на среде Эшби через 15–20 суток. После инкубации засеянные среды достать из термостата и в них подсчитать число колоний.

2. При подсчете колоний закрытые чашки Петри просматривать в проходящем свете и с внешней стороны колонии отмечать маркером. Чтобы не пропустить мелкие колонии, чашки дополнительно просматривать под лупой.

3. На предметные стекла сделать мазки стерильной бактериальной петлей, взяв слизь с комочков не затрагивая частицы почвы. Окрасить простыми методами (любым красителем – нативный препарат) и дифференциальными (по Граму).

4. Чтобы определить количество клеток в 1 г сырой почвы число колоний, полученное на чашку Петри, произвести перерасчет (Работа 3 Лабораторного практикума № 4).

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

1. Кривая роста бактериальной культуры, выращиваемой на богатой питательной среде при 37°C, показана на рисунке 1 (А). Если тот же организм выдержать 30 мин при 45°C, а затем перенести на богатую питательную среду при 37°C, то кривая роста приобретет вид, представленный на рисунке 1 (В).

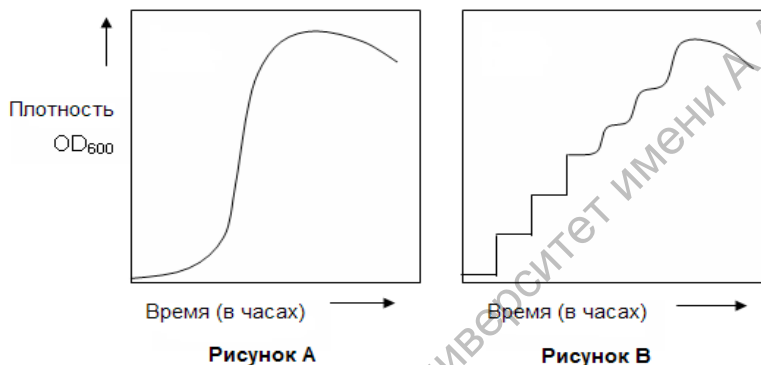


Рис. 1. Кривые роста бактериальных культур

Какое из следующих утверждений наиболее подходит для объяснения характера роста, изображенного на рисунке В?

- Нагрев убивает начальную бактериальную популяцию и наблюдаемый характер роста вызван загрязнением новым бактериальным штаммом.
- Нагрев вызывает задержку роста на определенной стадии, приводя к синхронизации клеток, т.е. к их делению в одно и то же время.
- Нагрев изменяет свойства поверхности клеток, приводя к ошибкам в измерениях плотности.
- Возрастание плотности вызвано не ростом, а возрастанием со временем лизиса клеток, подверженных нагреву.

2. Аммонификация – процесс:

- Превращения NO_2^- в NO_3^- ,
- Превращения N_2 в NH_4^+ ,
- Перехода NH_4^+ в NO_2^- ,
- Выделения NH_4^+ из органических веществ,
- Нет ни одного правильного ответа.

3. Штамм бактерий был выделен из горячего источника. Какой тип пары оснований будет преобладать в геноме?

- а) А-Т.
- б) С-Т.
- в) G-A.
- г) G-C.
- д) Т-G.

4. Процессы, осуществляемые азотфиксирующими бактериями, нитрифицирующими бактериями и денитрифицирующими бактериями в почве, и связанные с превращениями азота, можно расположить в следующем порядке:

- а) Восстановление, окисление и окисление.
- б) Восстановление, окисление и восстановление.
- в) Восстановление, восстановление и окисление.
- г) Окисление, окисление и восстановление.

5. Определите, какой тип почвенных бактерий НЕ является полезным для растений (рис. 2)? _____

Соотнесите группы бактерий с буквами на схеме

- а) Азотфиксирующие бактерии _____
- б) Нитрифицирующие бактерии _____
- в) Денитрифицирующие бактерии _____

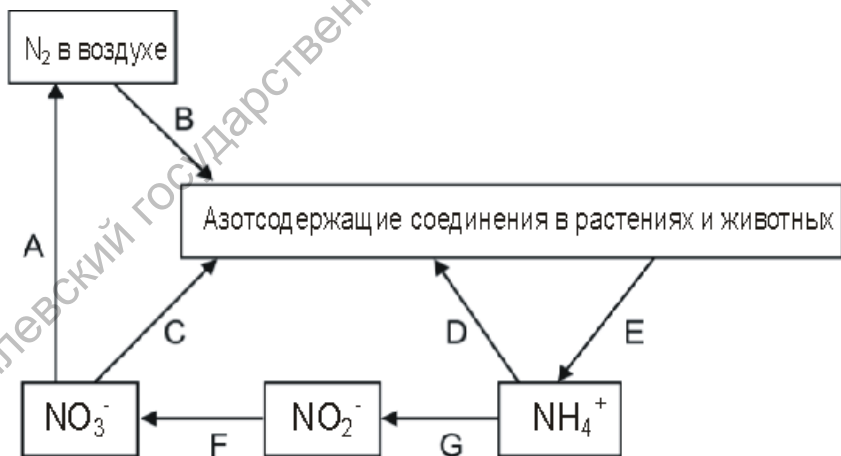


Рис. 2. Круговорот азота в природе

6. Рассмотрите схематичное строение бактериальной клетки.

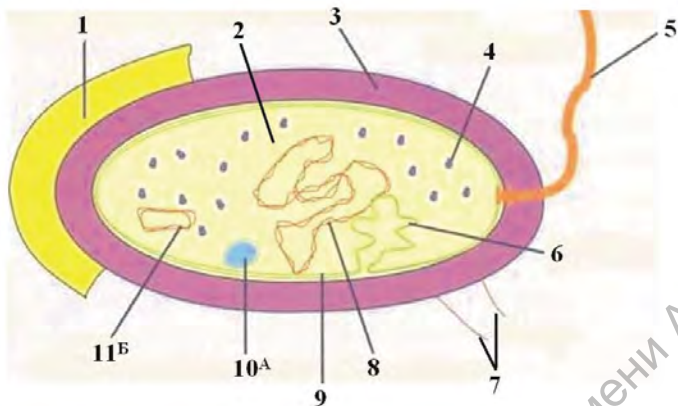


Рис. 3. Строение бактериальной клетки

Напишите названия структур, обозначенных номерами, в соответствующие линейки. Примечание:

А – структура дает окраску с раствором Люголя,

Б – структура обеспечивает устойчивость к антибиотикам.

- | | |
|----|----|
| 1 | 2 |
| 3 | 4 |
| 5 | 6 |
| 7 | 8 |
| 9 | 10 |
| 11 | |

Из каких веществ по химической природе построена структура 1?

Как называется вещество, из которого построена структура 3?

Как называется вещество, из которого построена структура 5?

7. Как называется плаزمида, обеспечивающая конъюгацию у бактерий *Escherichia coli*?

8. Как называется плазмида, которая может существовать в клетке как в автономном, так и во встроенном в хромосому состоянии?

9. При посеве *E. coli* (кишечной палочки) в среду с глюкозой и сорбитолом наблюдается диауксия (двухфазный характер роста, опыт Моно). В какой из указанных моментов времени клетки бактерии способны утилизировать глюкозу?

- а) только в I;
- б) только в II;

- в) только в III;
- г) во все указанные моменты.

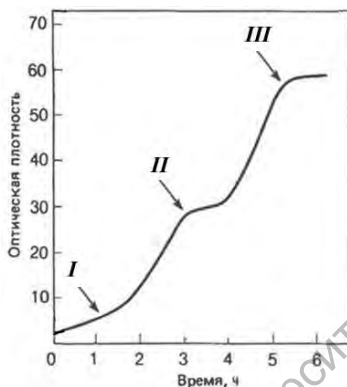


Рис. 4. Явление двухфазного роста бактерий на среде с различными питательными факторами

10. Фиксация бактериями N_2 ведет к:

- а) образованию ионов аммония и синтезу аминокислот;
- б) образованию ионов аммония и выделению их клетками (аммонификации);
- в) образованию аммония, который затем может быть окислен до нитрата с получением энергии;
- г) накоплению азота в газовых вакуолях.

11. Окраска по Граму включает этапы: окраска клеток на мазке генциан-виолетом, последующая обработка йодом, затем обработка спиртом, докрасивание красителем альтернативного (например, красным) цвета. Различие в окраске грамположительных и грамотрицательных бактерий (отсутствие окрашивания у грамотрицательных бактерий) обусловлено тем, что:

- а) у грамположительных бактерий комплекс генцианфиолетового с йодом не вымывается из клетки спиртом, поскольку муреиновый каркас достаточно толстый, а у грамотрицательных – вымывается;
- б) грамотрицательные бактерии не содержат муреин, и поэтому связывания не происходит;

в) клеточная стенка грамотрицательных бактерий очень тонка и легко разрушается под действием спирта;

г) грамотрицательные бактерии, как правило, окружены капсулой, не проницаемой для йода;

д) у грамположительных и грамотрицательных бактерий проявляются разные пигменты.

12. Микоплазмы устойчивы к пенициллину, действующему на синтез муреина, так как они:

а) не имеют клеточной стенки;

б) синтезируют псевдомуреин;

в) не образуют стеролы, взаимодействие с которыми необходимо для активации антибиотика;

г) содержат в клеточной стенке хитин;

д) синтезируют внеклеточные ферменты, разлагающие антибиотик до проникновения в клетку.

13. Хемолитотрофы могут использовать в качестве источника энергии:

а) молекулярный водород;

б) сульфат аммония;

г) Na-соли 3-х валентного фосфора;

д) хлорид ртути (сулему).

14. Микроорганизмы, нуждающиеся в факторах роста, называются:

а) ауксотрофами;

б) прототрофами;

в) олиготрофами;

г) фототрофами.

15. Бациллы это:

а) грамположительные спорообразующие палочки,

б) грамотрицательные спорообразующие палочки,

в) грамотрицательные неспорообразующие палочки,

г) грамположительные неспорообразующие палочки.

16. У основания жгутиков расположены крючок и парные диски, соединяющие их с цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой. Сколько пар дисков: у грамположительных бактерий _____, у грамотрицательных _____.

17. Роль внеклеточных полисахаридов у бактерий заключается в обеспечении:

- а) прикреплении клетки к частицам субстрата,
- б) образовании биопленки,
- в) антигенных свойств,
- г) защиты от высыхания,
- д) защиты от выедания животными.

18. Какие из утверждений НЕ ВЕРНО:

- а) плазмиды не имеют белковых оболочек,
- б) плазмиды являются кольцевыми молекулами двуцепочечной ДНК,
- в) плазмиды могут быть встроены в хромосому клетки-хозяина,
- г) гены плазмид необходимы для размножения,
- д) плазмиды полезны для их клеток-хозяев.

19. Некоторые прокариоты имеют жгутики. Найдите верные ответы:

- а) бактериальные жгутики покрыты двумя мембранами,
- б) и жгутики бактерий, и жгутики эукариот используют протонный градиент как непосредственный источник энергии,
- в) жгутики прокариот состоят из актина,
- г) жгутики прокариот – это белковые спиральные филаменты, прикрепленные к мультибелковым ротарам,
- д) жгутики прокариот могут вращаться только в одном направлении.

СЕМИНАРСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 1

ЦИТОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Контрольные вопросы:

1. Методы микробиологических исследований. Бактериоскопические методы исследования.

2. Основные принципы классификации микроорганизмов. Разнообразие микроорганизмов и их общность с другими организмами. Свойства микроорганизмов, функции, значение

3. Прокариотические и эукариотические организмы: сходства и основные различия.

4. Принципы таксономии и номенклатуры микроорганизмов. Домены. Систематика прокариот, проблемы, признаки микроорганизмов, используемые в систематике.

5. Группы прокариотических организмов.

6. Архебактерии.

7. Форма, размеры прокариот.

8. Структурно-функциональные подсистемы прокариотной клетки. Химический состав

9. Строение, функции клеточной стенки прокариот. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных эубактерий. Методика окрашивания по Граму. Клеточная стенка архебактерий

10. Прокариоты без клеточной стенки. L-трансформация.

11. Капсулы, слизистые слои, чехлы, межклеточный матрикс, биопленки. S- и R-формы бактерий

12. Жгутики. Строение жгутиков. Функции жгутиков, расположение. Антигенные свойства. Фимбрии и пили.

13. Механизмы движения. Таксисы бактерий (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис, магнитотаксис).

14. Генетический аппарат. Хромосомные и внехромосомные носители информации.

15. Нуклеоид, особенности хранения наследственной информации, принцип упаковки ДНК. Этапы транскрипции у прокариот, отличия

16. Мембраны, химический состав, структура. Мезосомы. Функции ЦПМ прокариот, свойства. Периплазматическое пространство. Обмен веществами через ЦПМ. Особенности ЦПМ архебактерий.

17. Цитоплазма бактерий; химический состав и организация.

18. Внутрицитоплазматические включения (гликоген, гранулеза, волютин, вещества жировой природы).

19. Рост и способы размножения (равномерное бинарное поперечное деление, почкование, множественное деление).

20. Спорообразование, другие покоящиеся формы бактерий (эндоспоры, экзоспоры, цисты, бактериоиды, гетероиды, акинеты, гормогонии). Строение, химический состав и свойства бактериальных эндоспор.

СЕМИНАРСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 2

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Контрольные вопросы:

1. Питательные среды в микробиологии (классификация, принцип изготовления). Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов.

2. Накопительные культуры, чистые культуры микроорганизмов; методы их получения. Рост клетки и бактериальной популяции. Кривая роста, характеристика отдельных фаз.

3. Распространение микроорганизмов в природе. Влияние физических и химических факторов среды на бактерии: влажность, температура, лучистая энергия, ультразвук, реакция среды, кислород, антисептики.

4. Взаимоотношения микроорганизмов. Ассоциативные взаимоотношения: метабиоз, симбиоз, комменсализм, сателлитизм. Конкурентные взаимоотношения: антагонизм, паразитизм.

5. Антибиотики. Продуценты антибиотических веществ. Механизм действия антибиотиков. Спектр действия. Антибиотикорезистентность бактерий.

6. Взаимоотношения микроорганизмов с растениями. Микрофлора ризосферы. Эпифитная микрофлора растений. Фитопатогенные микроорганизмы.

7. Взаимоотношения микроорганизмов с человеком и животными. Нормальная микрофлора человека и животных. Патогенные микроорганизмы. Инфекции. Факторы и механизмы естественной устойчивости.

8. Понятие о стерилизации, асептике, антисептике, дезинфекции. Пастеризация.

9. Виды и основные назначения метаболических реакций у бактерий, общая характеристика и особенности. Энергетический метаболизм. Источники энергии у микроорганизмов.

10. Хемосинтез и фотосинтез. Способы синтеза АТФ у микроорганизмов. Пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов.

11. Аэробное дыхание. Анаэробное дыхание. Брожение. Пути сбраживания углеводов и других соединений.

12. Фотосинтез у бактерий. Строение фотосинтетического аппарата бактериальной клетки. Фотосинтетические пигменты бактерий. Фотосинтез с выделением и без выделения молекулярного кислорода. Использование энергии света галобактериями.

13. Биосинтез аминокислот бактериями; основные предшественники и пути биосинтеза. Биосинтез углеводов, нуклеотидов, жирных кислот и фосфолипидов. Ассимиляция углекислоты автотрофными и гетеротрофными микроорганизмами.

14. Изменчивость микроорганизмов. Понятие об адаптации микроорганизмов. Модификационная изменчивость у бактерий. Мутации у бактерий.

15. Характеристика способов генетического обмена у бактерий. Бактериальная трансформация. Бактериальная конъюгация. Донорные и реципиентные бактерии и их характеристика. Половой фактор. Бактериальная трансдукция.

16. Плазмиды бактериальных клеток; природа, организация, свойства и значение для бактериальной клетки. Взаимодействие плазмид с хромосомой. Использование плазмид в генетической инженерии. Мигрирующие генетические элементы бактерий.

17. Системы рестрикции и модификации бактериальной клетки. Типы ферментов рестриктаз. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках микроорганизмов.

18. Распространенность, роль микроорганизмов в круговороте веществ, в почвообразовательных процессах и плодородии почвы. Значение микроорганизмов в первичной продукции водоемов и минерализации органических веществ. Роль микроорганизмов в переработке отходов и детоксикации веществ.

19. Процессы трансформации углеродсодержащих веществ. Разложение целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и пектина. Трансформация углеводов.

20. Процессы трансформации азотсодержащих веществ. Аммонификация белков, нуклеиновых кислот и мочевины. Нитрификация. Денитрификация. Биологическая фиксация молекулярного азота. Свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие бактерии.

21. Процессы трансформации соединений фосфора. Минерализация фосфорорганических соединений растительного и животного опада. Трансформация неорганических соединений фосфора.

22. Процессы трансформации соединений серы. Минерализация серосодержащих органических веществ.

СЕМИНАРСКОЕ ЗАНЯТИЕ № 3

МНОГООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Контрольные вопросы:

1. Положение микроорганизмов в системе живого мира. Разнообразие микроорганизмов и их общность с другими организмами. Особенности систематики вирусов, бактерий, грибов, простейших. Размеры микроорганизмов.

2. Генетические, фенотипические и серологические критерии систематики. Принципы видовой идентификации микроорганизмов.

3. Фототрофные бактерии. Характеристика цианобактерий, пурпурных и зеленых бактерий, гелиобактерий.

4. Хемолитотрофные бактерии. Нитрифицирующие бактерии.

5. Бактерии, окисляющие неорганические соединения серы. Железобактерии. Водородные бактерии. Карбоксидобактерии.

6. Миксобактерии и цитофаги. Риккетсии и хламидии. Спирохеты. Псевдомонады.

7. Свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы.

8. Группа молочнокислых бактерий. Энтеробактерии. Коли-титр и коли-индекс.

9. Пропионовокиетные бактерии. Спорообразующие бактерии. Грамотрицательные кокки, входящие в семейство Neisseriaceae. Коринеформные бактерии.

10. Микобактерии. Актиномицеты. Микоплазмы. Метилотрофные бактерии. Архебактерии.

11. Микроорганизмы почвы.

12. Микрофлора воды.

13. Микрофлора воздуха.

14. Микроорганизмы, обитающие в организме человека и животных.

15. Микроорганизмы, ассоциированные с растениями.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Лабораторное занятие № 1 СВЕТОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ	3
Лабораторное занятие № 2 МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	13
Лабораторное занятие № 3 БРОЖЕНИЕ КАК СПОСОБ ОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ.....	34
Лабораторное занятие № 4 ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ВОЗДУХА, ВОДЫ, ПОЧВЫ.....	43
Лабораторное занятие № 5 МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	51
Лабораторное занятие № 6 ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ	63
Лабораторное занятие № 7 РАЗЛОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ.....	67
Лабораторное занятие № 8 ТИПЫ БИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МИКРО- И МАКРООРГАНИЗМОВ	74
Задания для самостоятельного контроля знаний	76
Семинарское занятие № 1 ЦИТОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	82
Семинарское занятие № 2 ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	83
Семинарское занятие № 3 МНОГООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	85