



Учреждение образования
«Международный государственный
экологический институт
имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета



**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ**



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Рекомендовано учебно-методическим объединением
по экологическому образованию в качестве пособия
для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальности
1 – 33 01 05 Медицинская экология

Минск
«ИВЦ Минфина»
2017

УДК 579(076)

ББК 28.4я7

Л 12

Авторы:

кандидаты биологических наук, доценты кафедры иммунологии МГЭИ
им. А. Д. Сахарова БГУ *Е. Р. Грицкевич, Н. В. Иконникова;*

кандидаты сельскохозяйственных наук, доценты кафедры экологической
и молекулярной генетики МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ *И. Э. Бученков,*
О. С. Рышкель;

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биохимии и био-
технологии растений *А. Г. Шутова*

Рецензенты:

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории белка Ин-
ститута микробиологии НАН Беларуси *И. А. Гончарова;*

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии УО
«Полесский государственный университет» *А. Г. Чернецкая;*

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры общей биологии
и ботаники УО «Белорусский государственный педагогический университет имени
Максима Танка» *Е. В. Жудрик*

Лабораторный практикум по микробиологии: пособие /
Л12 Е. Р. Грицкевич [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 113 с.

ISBN 978-985-7142-96-5.

В пособии представлены темы, в которых используются современные методы исследования морфологических, физиологических и биохимических свойств микроорганизмов. Рассмотрены способы приготовления препаратов для микроскопического анализа, изложены приемы исследования микрофлоры воды, воздуха и почвы. Включен словарь терминов, а также рекомендованы классические учебные пособия и новейшая литература. Предлагаемое издание написано в соответствии с типовой учебной программой для вузов.

Предназначено для студентов дневной и заочной формы обучения для проведения лабораторных занятий при изучении дисциплин микробиологического и экологического профиля.

УДК 579(076)

ББК 28.4я7

ISBN 978-985-7142-96-5

© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Требования к содержанию и оформлению лабораторных работ	6
Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории	6
<i>Лабораторная работа № 1</i> Методы исследования микроорганизмов. Морфология микроорганизмов	8
<i>Лабораторная работа № 2</i> Приготовление микробиологических препаратов. Методы исследования органоидов, структурных элементов и включений . .	24
<i>Лабораторная работа № 3</i> Молочнокислородное брожение бактерий	34
<i>Лабораторная работа № 4</i> Маслянокислородное брожение бактерий	43
<i>Лабораторная работа № 5</i> Микроорганизмы воздуха. Культуральные свойства микроорганизмов	47
<i>Лабораторная работа № 6</i> Культивирование микроорганизмов на питательных средах. Методы выделения чистых культур микроорганизмов	58
<i>Лабораторная работа № 7</i> Микрофлора воды	69
<i>Лабораторная работа № 8</i> Взаимоотношения между микроорганизмами	74
<i>Лабораторная работа № 9</i> Микрофлора почвы	81
Словарь микробиологических терминов	91
Вид бактериальных препаратов при микроскопировании	98
Литература	112

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – раздел биологической науки, изучающий систематику, морфологию, закономерности развития, физиологию, биохимию, генетику различных микроорганизмов, распространение и роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе, значение в жизнедеятельности человека.

Области микробиологических исследований:

1. Эволюция и филогенетическое положение микроорганизмов.
2. Выделение, культивирование и идентификация микроорганизмов.
3. Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов.
4. Исследование микроорганизмов на популяционном уровне.
5. Изучение различных форм взаимоотношений между микроорганизмами (сапрофитизм, паразитизм, симбиоз, антагонизм и др.).
6. Роль микроорганизмов в круговороте веществ.
7. Обмен веществ микроорганизмов.
8. Использование микроорганизмов и продуктов их метаболизма в различных областях промышленности, сельском хозяйстве и охране окружающей среды.

Лабораторные занятия по микробиологии являются одним из важнейших видов подготовки биологов. Они способствуют закреплению теоретических знаний, развивают навыки самостоятельной практической работы, формируют умение грамотно анализировать полученные результаты и дают возможность наблюдать за жизнедеятельностью микроорганизмов. Лабораторный практикум по микробиологии является пособием, цель которого помочь студентам самостоятельно подготовиться к выполнению практических занятий по микробиологии.

Лабораторные занятия описаны по единой схеме. Приводятся название темы лабораторной работы, цель, материалы и оборудование, краткая теоретическая часть, задания и методика их выполнения. В теоретической части сжато излагаются основные вопросы и сведения, необходимые для выполнения практической работы, наиболее важные вопросы дополняются вспомогательными иллюстрациями. В конце каждой лабораторной работы помещены вопросы для самоподготовки к занятию и закрепления пройденного материала; приведена учебная карта к занятию, где подробно описан порядок выполнения работы и способ отражения результатов выполнения с примерами, необходимыми для заполнения таблиц.

Справочный материал позволит студенту лучше уяснить содержание лабораторной работы, точнее определить вид бактериальных препаратов при микроскопировании.

Лабораторный практикум написан в соответствии с типовой учебной программой для высших учебных заведений по специальности 1-33 01 05 «Медицинская экология». В нем на современном научном уровне рассмотрены методики приготовления микропрепаратов, методы изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов различных групп.

ТРЕБОВАНИЯ К СОДЕРЖАНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

1. Лабораторные работы оформляются в тетради каждым студентом индивидуально.

2. Лабораторная тетрадь подписывается студентом до начала выполнения первой лабораторной работы.

3. Каждая лабораторная работа должна содержать следующие структурные элементы:

✓ Наименование лабораторной работы.

✓ Цель занятия. Перечень необходимых материалов и оборудования.

✓ Результаты и обсуждение:

а) наименование задания,

б) указанный в разделе «Учебная карта занятия» экспериментальный материал, полученный ЛИЧНО студентом в ходе выполнения лабораторной работы.

✓ Выводы.

4. Лабораторная работа, оформленная в соответствии с данными требованиями, представляется в конце КАЖДОГО ЗАНЯТИЯ на подпись преподавателю.

ПРАВИЛА ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Прежде чем начинать освоение практических навыков по микробиологии, следует запомнить несколько простых правил по технике безопасности при работе с микробными культурами. Несмотря на то, что Вы не будете работать с патогенными культурами бактерий, важно научиться работать **правильно** и выполнять все требования по технике безопасности.

1. Работать в лаборатории можно только в спецодежде – не забывайте о халате.

2. Как и в любой другой, в микробиологической лаборатории нельзя есть, пить, курить, шуметь, бегать. Не проводите перерывы в лабораторном помещении.

3. Основная опасность – живая культура бактерий. Поэтому приступайте к выполнению заданий спокойно, после организации рабоче-

го места. Уберите личные вещи, достаточно иметь тетрадь по лабораторным занятиям со схемой опыта.

4. Работать нужно сидя, причем наклонять туловище над столом не следует. Вы должны находиться строго перпендикулярно рабочей поверхности лабораторного стола и наблюдать за своими руками как бы со стороны.

5. Все пробирки с микробными культурами должны стоять в штативах. Не кладите их на стол в горизонтальном положении. Штатив с пробирками должен стоять слева от Вас (и справа, если Вы – левша). Пробирки Вы берете левой рукой, а в правой (активной) руке – находится основной микробиологический инструмент – бактериологическая петля.

6. Вы работаете только с помощью петли, поэтому дополнительной защиты (перчаток) для выполнения работ Вам не понадобится.

7. Если Вы случайно пролили микробную культуру на стол или на руки – сообщите преподавателю. Порядок дальнейших действий следующий: обработать поверхность раствором дезинфектанта (промыть или протереть), который всегда есть в учебной аудитории, после этого руки дополнительно следует вымыть водой и мылом.

8. Помните, что при стерилизации бактериологической петли, она нагревается – держите петлю только за пластмассовый держатель и никогда не касайтесь пальцами самой петли. Петля должна как и пробирки с микробной культурой стоять в штативе. Не оставляйте петлю с остатками бактериальной культуры – это является важным фактором контаминации посевов, предметов окружающей среды и даже инфицирования работающих рядом с Вами коллег. После и перед любой манипуляцией простерилизуйте петлю.

9. Вы работаете с открытым пламенем спиртовки, помните об этом. Особая опасность – болтающиеся рукава халата, подверните их или застегните манжеты. Все длинные прически на период лабораторного занятия следует превратить в короткие! Помните – волосы горят в течение 5 секунд! Не наклоняйтесь над спиртовкой. Зажигайте ее только на периоды выполнения манипуляции.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Методы исследования микроорганизмов.

Морфология микроорганизмов

Цель занятия: ознакомиться с оборудованием рабочего места в микробиологической лаборатории, а также техникой безопасности при работе с микроорганизмами; овладеть методиками приготовления основных микробиологических препаратов; изучить морфологические формы бактерий на примере чистых культур микроорганизмов и микрофлоры полости рта.

Материалы и оборудование. Инструкция по технике безопасности при работе с культурами микроорганизмов, журнал по технике безопасности, посевы микроорганизмов на чашках Петри, в пробирках со скошенным агаром, спички, карандаш по стеклу, вазелин, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, шпатель Дригальского, пипетка Пастера, пипетка стеклянная градуированная, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги.

Задачи:

1. Ознакомиться с оборудованием рабочего места и техникой безопасности при работе с микроорганизмами.
2. Изучить методы исследования микроорганизмов: освоить методы приготовления микробиологических препаратов и приемы микроскопирования.
3. Изучить морфологические формы бактерий.
4. Закрепить полученные знания при исследовании микрофлоры полости рта.

Задание 1. Ознакомиться с оборудованием рабочего места и техникой безопасности при работе с микроорганизмами

В учебных заведениях не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами. Однако необходимо помнить, что при посеве сапрофитных микроорганизмов из окружающей среды случайно может быть внесена и патогенная микрофлора. Поэтому работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения техники безопасности.

Подготовка микробиологической лаборатории к работе.

Для того чтобы снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях, в лабораторных помещениях применя-

ют различные способы дезинфекции. Слово «дезинфекция» означает обеззараживание, то есть уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают растворами различных дезинфицирующих веществ, в качестве которых чаще всего используют 2–3 %-ный раствор соды (бикарбоната натрия), 3–5 %-ный раствор фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина и некоторые другие дезинфектанты.

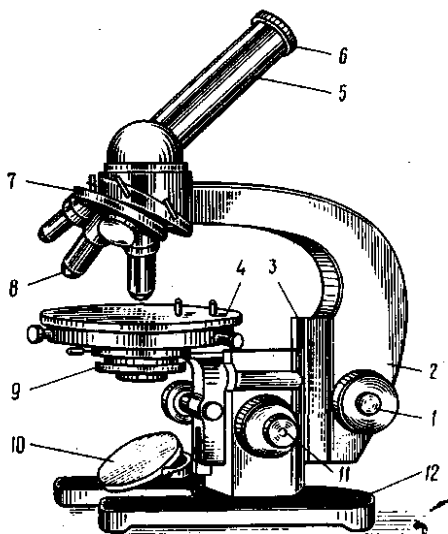
Воздух в лаборатории наиболее доступно дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30–60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха – облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70 %-ные (по объему) растворы изопропилового или этилового спиртов. В лаборатории не разрешается курить, хранить и употреблять еду, напитки, жевательную резинку. Работать следует в халатах.

Для работы в учебной микробиологической лаборатории используется следующее оборудование:

Микроскоп. Для изучения морфологии микроорганизмов используют микроскопы. Биологический микроскоп (рис. 1) представляет собой оптический прибор, увеличивающий предметы в 1000–15 000 раз и состоящий из механической, оптической и осветительной систем.

Механическая система микроскопа – это подковообразная ножка, тубусодержатель, тубус, предметный столик, винты. *Оптическая система* включает объективы и окуляр. *Осветительная система* состоит из конденсора с диафрагмой и зеркала.



*Рис. 1. Биологический световой микроскоп:
 1 – макровинт, 2 – тубусодержатель, 3 – шарнирное соединение,
 4 – предметный столик; 5 – тубус, 6 – окуляр, 7 – револьвер,
 8 – объективы, 9 – конденсор, 10 – зеркало,
 11 – микровинт, 12 – основание*

Тубусодержатель и подковообразное основание соединены между собой подвижно шарниром. Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнюю часть тубуса вставлен окуляр, в нижнюю – вращающийся вокруг своей оси револьвер, в который ввинчены объективы. Тубус передвигается вверх и вниз при помощи макрометрического и микрометрического винтов. Один оборот микрометрического винта передвигает тубус на 0,1 мм. Поэтому микровинтом пользуются для более точной наводки, а для предварительной – макровинтом. Предметный столик предназначен для размещения исследуемого материала. Столик можно передвигать в различных направлениях с помощью винтов.

Конденсор состоит из линз, собирающих отраженные от зеркала лучи в сильный световой пучок, и направляет его через отверстие предметного столика на препарат.

При определении подвижности неокрашенных препаратов конденсор должен быть несколько опущен. Диафрагма находится между зеркалом и конденсором и служит для регулирования количества света, поступающего в конденсор.

Объектив состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя линза служит для увеличения предмета, остальные – для коррекции изображения. Современные биологические микроскопы имеют не менее трех объективов. Сухие объективы увеличивают в 8 и 40 раз (между объективами и препаратом находится слой воздуха), иммерсионные – в 90 раз. На оправу каждого объектива нанесена цифра, указывающая увеличение. При микроскопии окрашенных препаратов пользуются иммерсионным объективом, погружая переднюю линзу в каплю иммерсионного масла, нанесенного на предметное стекло с окрашенными бактериями. Благодаря этому все лучи от осветителя, не изменяя своего направления, попадают в объектив и получается четкое изображение.

Окуляр состоит из верхней (глазной и нижней) собирающей линз. На верхней части окуляра имеется цифра, указывающая увеличение (7х, 10х, 15х). Окуляр увеличивает только изображение. Общее увеличение микроскопа складывается из произведения увеличения объектива на увеличение окуляра.

Рабочий стол для микроскопирования препаратов желательно размещать у окна. Микроскоп устанавливают на рабочий стол тубусодержателем к себе примерно на 7–10 см от края. Вначале проводят настройку освещения, для чего зеркалом направляют пучок света от источника освещения в объектив с увеличением в 8 раз. При правильной настройке освещения поле зрения микроскопа должно быть в виде равномерно освещенного круга. После этого на предметный столик помещают исследуемый препарат, который закрепляют клеммами и рассматривают под микроскопом, пользуясь объективами с увеличением в 8, 40 или 90 раз.

При работе с объективами 8х и 40х тубус микроскопа осторожно опускают с помощью макрометрического винта, приближают объектив почти вплотную к препарату, но не касаются его. Наблюдают в окуляр, слегка приподнимая тубус тем же винтом до получения изображения. С помощью микрометрического винта проводят точную установку объектива до получения четкого изображения предмета.

При работе с иммерсионным объективом (увеличение в 90 раз) на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла, а затем под контролем глаза макрометрическим винтом опускают объектив в каплю масла. Точную установку препарата в фокус объектива проводят с помощью микрометрического винта, который вращают в обратном направлении до получения четкого изображения. При

нанесении капли иммерсионного масла не происходит рассеивания луча света, а значит хорошо освещается поле зрения (рис. 2).

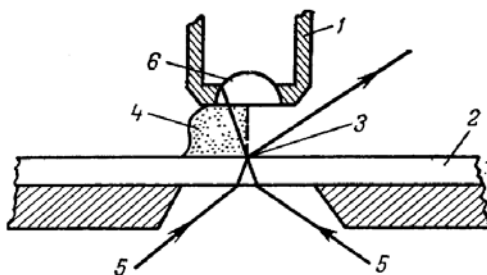


Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе:

1 – объектив микроскопа, 2 – предметное стекло, 3 – объект исследования, 4 – иммерсионное масло, 5 – лучи света, 6 – фронтальная линза объектива

По окончании работы исследуемый материал снимают с предметного столика. Мягкой тканью, смоченной в очищенном бензине или эфире, удаляют иммерсионное масло с объектива, на предметный столик помещают квадрат из фланели, опускают конденсор и убирают микроскоп в место, предохраняющее его от пыли и сырости.

Принцип действия **люминесцентного микроскопа** основан на способности отдельных объектов и красителей светиться при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Люминесцентные микроскопы снабжены источником ультрафиолетового света и набором светофильтров. У бактерий очень слабо выражена собственная флюоресценция. Поэтому необходимо их обработать флюоресцирующими красками (флюорохромами), которые окрашивают структурные элементы клетки в различные цвета.

Принцип действия **электронного микроскопа** основан на использовании вместо световых лучей потока электронов, получаемых из электронной пушки. Все оптические линзы заменены электромагнитными катушками, создающими электромагнитное поле, которое управляет движением электронов. Электронный микроскоп увеличивает предмет в 50–200 тыс. раз. Препараты для исследования готовят на тонких пленках коллодия. На пути потока электронов ставят исследуемый объект, который отражается на люминесцирующем экране. Изображение объекта можно сфотографировать аппаратом, вмонтированным в микроскоп. С помощью электронной микроскопии можно детально изучать строение бактерий, вирусов, бактериофагов.

Предметные стекла. Служат для приготовления микробиологических препаратов. Предметные стекла имеют размеры 26×76 мм. Толщина стекла 1 мм. Существуют модификации предметных стекол (рис. 3):

- стекло предметное с заточенным краем для растяжки мазков;
- стекло предметное с лункой для микроскопии препаратов «висячая капля»;
- стекло предметное с полосой для записи.

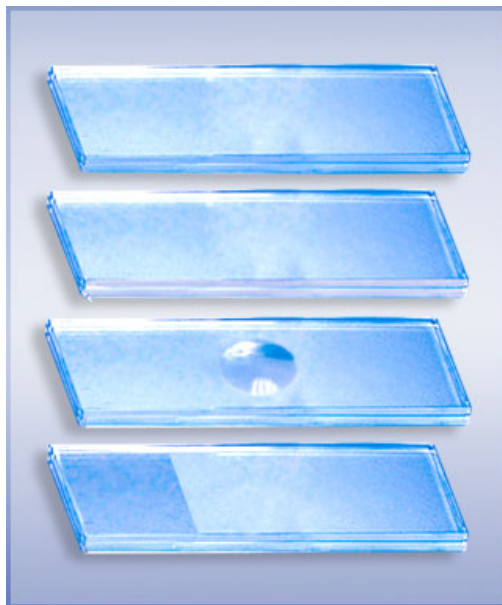


Рис. 3 Стекла предметные различного назначения

Покровные стекла. Покровное стекло предназначено для защиты объектива микроскопа, а в случае получения препарата «висячая капля» на него наносится исследуемая культура микроорганизмов. Толщина стекла 0,2 мм. Размеры покровных стекол 18×18, 24×24, 24×48 мм (рис. 4, В).

Микробиологическая петля. Состоит из петледержателя и собственно петли, изготовленной из нихромовой нити различного диаметра (рис. 4, Д).

Чашка Петри (изобретена в 1877 г. немецким бактериологом Юлиусом Рихардом Петри, ассистентом Роберта Коха) обычно изго-

тавливается из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол) и может иметь самые различные размеры. Наиболее часто используемые варианты имеют диаметр порядка 50–100 мм и высоту около 15 мм. Чашка широко используется в микробиологии для культивирования колоний микроорганизмов. Для этой цели она заполняется слоем питательной среды, на который производят посев культуры микроорганизмов. Стеклянные чашки – многоразовые, но требуют стерилизации перед повторным посевом. Чашки из пластических материалов поставляются стерильными, в герметичной упаковке (рис. 4, А).

Шпатель Дригальского предназначен для засева материала на плотные питательные среды. Выпускаются шпатели L- и T-формы. Гладкая поверхность рабочей части шпателя позволяет избегать повреждения агара (рис. 4, Е).

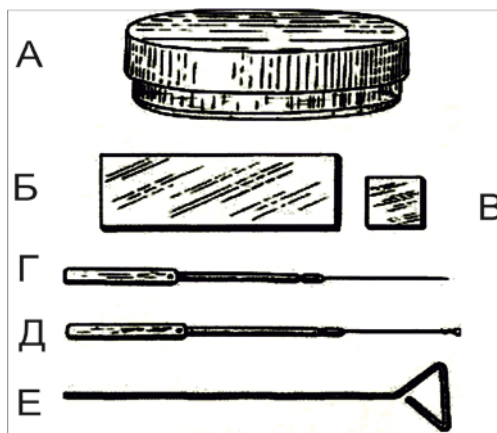


Рис. 4. Микробиологическая посуда:

А – чашка Петри, Б – стекло предметное, В – стекло покровное, Г – игла микробиологическая, Д – петля микробиологическая, Е – шпатель Дригальского

Задание 2. Изучить методы исследования микроорганизмов

Препараты (мазки) готовят из бактериальных культур. Бактериальная чистая культура – это культура, состоящая из микробных клеток одного **вида**. По способу получения представляет собой потомство (**клон**) одной клетки.

В лаборатории микроорганизмы выращивают в питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы и чашки Петри. Внесение

микроорганизмов в стерильную среду называется **посевом**, или **инокуляцией**. Перед посевом следует тщательно надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают маркером на стекле или на наклеенной этикетке. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей, если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, если пересевают культуры микроорганизмов, выросших в жидкой питательной среде, пользуются стерильной пипеткой. И использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 3–5 %-ный водный раствор фенола или 2 %-ный раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

При приготовлении препаратов из культуры бактерий, выросших на питательных средах, необходимо соблюдать правила **асептики**.

Приготовление мазка из культуры, выращенной на скошенном агаре – «косяке» (рис. 5):

1. Предметное стекло аккуратно берут за ребро и наносят номер или наименование бактериальной культуры.
2. Зажигают спиртовку.
3. Фламбируют поверхность стекла, где будет располагаться мазок.
4. Стекло помещают вблизи спиртовки на чашку Петри.
5. На предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды.
6. В левую руку берут пробирку с культурой и помещают между 1 и 2 пальцами таким образом, что ладонь находится под пробиркой и горлышко пробирки направлено в зону спиртовки.
7. В правую берут бактериальную петлю, как карандаш.
8. Петлю фламбируют до покраснения сначала горизонтально, затем вертикально (1).
9. Не выпуская петли, мизинцем правой руки прижимают пробку пробирки к ладони (2) и осторожно вынимают ее из пробирки. Движения должны быть плавными.
10. Горло пробирки обжигают (3).
11. Вводят в пробирку петлю, охлаждая ее о стенки пробирки (4).
12. Осторожно закрывают и захватывают петлей культуру, не повреждая агара, и вынимают петлю, не касаясь ею стенок пробирки (5).
13. Прожигают горло пробирки и пробку в пламени, одновременно. Закрывают пробирку (6).
14. Петлю с культурой вносят в каплю дистиллированной воды и осторожно эмульгируют, не заходя за границы мазка (7).

15. Бактериальную петлю с остатками культуры прожигают до покраснения в пламени спиртовки (8).

16. Пробирку с культурой и петлю ставят в штатив.

17. Приготовленный мазок высушивают либо на воздухе, либо высоко над пламенем спиртовки.

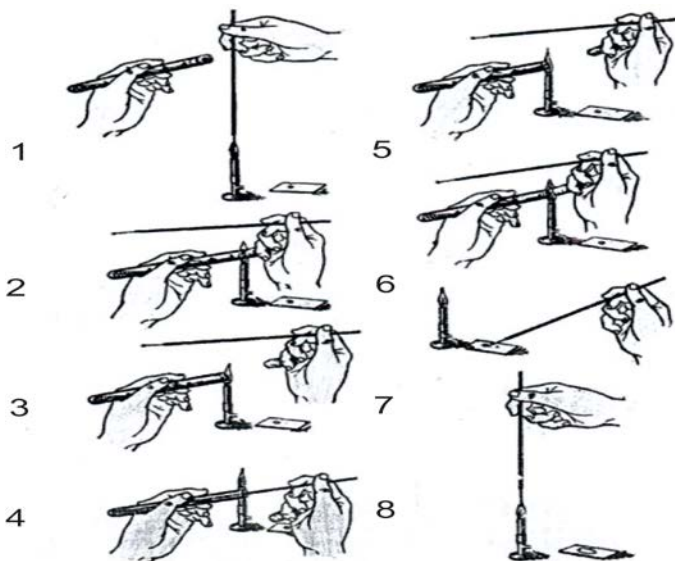


Рис. 5. Алгоритм приготовления мазка

Примечания:

1. Приготовление мазка из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, не требует использования дистиллированной воды или физраствора.

2. При приготовлении мазка из культуры, выросшей на чашке Петри, необходимо:

- отметить изолированную колонию со стороны дна чашки;
- чашку берут в левую руку и в сторону спиртовки приоткрывают крышку, придерживая ее 1 и 2 пальцами левой руки;
- прокаленную петлю вводят под крышку чашки, остужая ее о край среды;
- осторожно откалывают часть выделенной колонии и, не задевая края чашки, выносят на стекло с дистиллированной водой;
- дальнейшие манипуляции – согласно общему алгоритму.

Для приготовления прижизненных микробиологических препаратов используются методы раздавленной и висячей капли.

Метод «раздавленная капля». На середину чистого, обезжиренного предметного стекла наносят бактериологической петлей каплю культуры микроорганизмов, выращенную в жидкой питательной среде, осторожно накрывают покровным стеклом. Капля тонким слоем заполняет пространство между покровным и предметным стеклом.

Для приготовления препарата из культуры микробов, выращенных на плотной питательной среде, вначале на предметное стекло наносят каплю стерильной воды, а затем в нее вносят небольшое количество изучаемых микроорганизмов и накрывают покровным стеклом (рис. 6).

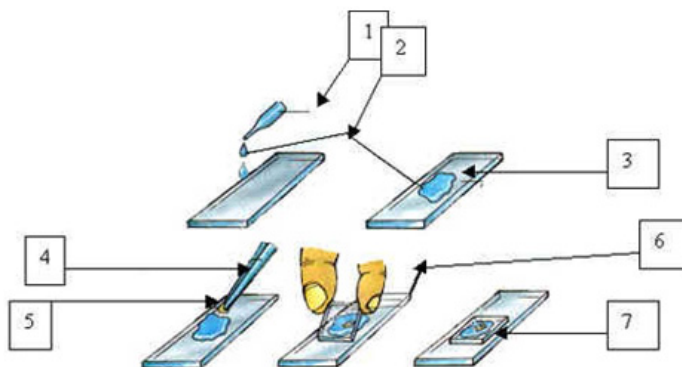


Рис. 6. Приготовление препарата «раздавленная капля»: с помощью пипетки (1) капля воды (2) наносится на середину чистого обезжиренного стекла (3), куда с помощью микробиологической петли (4) вносят культуру микроорганизмов (5), не допуская растекания жидкости (6), каплю осторожно накрывают покровным стеклом (7)

Метод «висячая капля». Культуру микроорганизмов наносят бактериологической петлей на покровное стекло, а к нему прикладывают предметное стекло с углублением (лункой). Края лунки предварительно смазывают вазелином, чтобы прикрепить покровное стекло. Для рассматривания под микроскопом препарат помещают на предметный столик покровным стеклом вверх, то есть к объективу. Капля свободно висит в лунке и долго не высыхает, что позволяет длительное время наблюдать за подвижностью микробных клеток.

Задание 3. Изучить морфологические формы бактерий

К морфологическим свойствам относятся не только форма, но и размер клеток, расположение клеток в пространстве, наличие спор

и капсул, подвижность и характер окраски бактерий по Граму. Морфология бактерий зависит от условий выращивания на питательных средах, температуры и других факторов. Наиболее типична морфология бактерий в молодых культурах.

Среди основных морфологических форм бактерий различают (рис. 7):

✓ **шаровидные (кокковые)**, которые по характеру взаиморасположения делятся на: микрококки (отдельное расположение); диплококки (сцепленные попарно); тетракокки (сцепленные по четыре); стрептококки (сцепленные в цепочку); сарцины (сцепленные в пакеты по 8, 12, 16 и т. д.); стафилококки (сцепленные беспорядочно в виде виноградной грозди);

✓ **палочковидные**, которые различаются по форме: правильная (энтеробактерии, псевдомонады); неправильная (коринебактерии).

✓ **по размеру:** мелкие (бруцеллы, бордетеллы); средние (бактероиды, кишечная палочка); крупные (бациллы, клостридии);

✓ **по форме концов:** обрубленные (бациллы); закругленные (сальмонеллы, псевдомонады); заостренные (фузобактерии); утолщенные (коринебактерии);

✓ **по характеру взаиморасположения все палочки делятся на:** расположенные одиночно; диплобактерии или диплобациллы (сцепленные попарно); стрептобактерии и стрептобациллы (сцепленные в цепочку);

✓ **извитые формы** – по характеру и количеству завитков они делятся на: вибрионы (слегка изогнутые палочки или неполные завитки); спириллы (один или несколько завитков); спирохеты, которые в свою очередь делятся на: лептоспиры (завитки с загнутыми крючкообразными концами – S-образная форма); боррелии (4–12 неправильных завитков); трепонемы (14–17 равномерных мелких завитков).

Размеры бактерий в среднем составляют 0,5–5 мкм. *Escherichia coli*, например, имеет размеры 0,3–1 на 1–6 мкм, *Staphylococcus aureus* – диаметр 0,5–1 мкм, *Bacillus subtilis* – 0,75 на 2–3 мкм. Крупнейшей из известных бактерий является *Thiomargarita namibiensis*, достигающая размера в 750 мкм (0,75 мм). Спирахеты могут вырастать в длину до 250 мкм при толщине 0,7 мкм. В то же время к бактериям относятся самые мелкие из имеющих клеточное строение организмов. *Mycoplasma mycoides* имеет размеры 0,1–0,25 мкм.

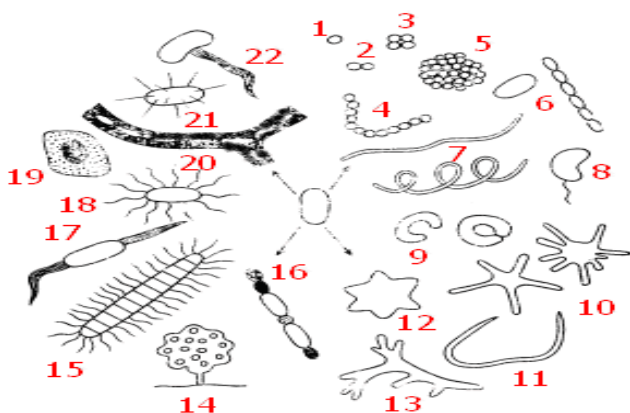


Рис. 7. Формы бактерий (по М. В. Гусеву):

1 – кокк, 2 – диплококк, 3 – тетракокк, 4 – стрептококк, 5 – колония сферической формы, 6 – палочковидные бактерии (одиночная клетка и цепочка клеток), 7 – спириллы, 8 – вибрион, 9 – бактерии, имеющие форму замкнутого или незамкнутого кольца, 10 – бактерии, имеющие выросты (простеки), 11 – бактерия червеобразной формы, 12 – бактериальная клетка в форме шестигульной звезды, 13 – актиномицет, 14 – плодовое тело миксобактерии, 15 – нитчатая бактерия рода *Caryorhapon* с латерально расположенными жгутиками, 16 – нитчатая цианобактерия, образующая споры (акинеты) и гетероцисты, 15, 17, 18 – бактерии с различными типами жгутикования, 19 – бактерии, образующие капсулу, 20 – нитчатые бактерии, заключенные в чехол, инкрустированный гидратом окиси железа, 21 – бактерия, образующая шипы, 22 – *Galionella*

Задание 4. Ознакомиться с микрофлорой полости рта

Вся нормальная микрофлора человека подразделяется на резидентную (постоянную – **автохтонную** (облигатную), составляющую до 90 % присутствующих в организме микроорганизмов, **аллохтонную** (факультативную) – менее 9,5 %) и транзиторную (случайную) – до 0,5 %. Около 20 % микроорганизмов от общего числа обитает в полости рта (более 200 видов), 18–20 % приходится на кожные покровы, 15–16 % на глотку, а больше всего микроорганизмов (до 40 %) в желудочно-кишечном тракте.

Нормальная микрофлора организма начинает формироваться при рождении ребенка. В полости рта новорожденного она представлена лактобациллами, негемолитическими стрептококками и непатогенными стафилококками. В течение 6–7 дней эти микроорганизмы сменяются микробами, характерными для взрослого человека.

Главными обитателями полости рта у взрослого человека являются бактерии преимущественно анаэробного типа дыхания (3/4 всех микробных видов), остальные виды представлены факультативными анаэробами. В ротовой полости самую большую группу бактерий составляют кокки.

Pod *Staphylococcus*. Стафилококки в полости рта здорового человека встречаются в среднем в 30 % случаев. В зубном налете и на деснах здоровых людей присутствуют в основном *Staphylococcus epidermidis*. У некоторых людей в полости рта могут обнаруживаться и *Staphylococcus aureus*.

Обладая значительной ферментативной активностью, стафилококки принимают участие в расщеплении остатков пищи в полости рта. Патогенные стафилококки, встречающиеся на слизистой носоглотки и в полости рта, являются частой причиной эндогенных инфекций, вызывая различные гнойно-воспалительные процессы полости рта.

Pod *Streptococcus*. Стрептококки являются основными обитателями полости рта (в 1 мл слюны до 10^8 – 10^{11} стрептококков). В окрашенных мазках стрептококки располагаются в виде цепочек, грамположительны. Большинство из них являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами, но встречаются и строгие анаэробы (например, пептострептококки). Обладая значительной ферментативной активностью, стрептококки сбраживают углеводы с образованием молочной кислоты, вызывая молочнокислородное брожение. Кислоты, появляющиеся в результате брожения, подавляют рост ряда гнилостных микробов, встречающихся в полости рта. Колонизация оральными стрептококками различных участков ротовой полости имеет качественные и количественные вариации в зависимости от условий жизни. *S. salivarius* и *S. mitis* в 100 % случаев присутствуют в полости рта. *S. mutans* и *S. sanguis* обнаруживаются в большом количестве на зубах, а *S. salivarius* – главным образом на поверхности языка. *S. mutans* и *S. sanguis* выявлялись в ротовой полости только после повреждения зубов.

Pod *Veillonella*. Вейллонеллы – это мелкие грамотрицательные кокки, располагаются кучками, парами или короткими цепочками.

Pod *Neisseria*. Нейссерии – грамотрицательные диплококки. Строгие аэробы. Нейссерии всегда в большом количестве встречаются в полости рта здоровых людей (до 1–3 млн в 1 мл слюны).

В полости рта, помимо кокков, обитают разнообразные палочковидные формы бактерий. *Pod Fusobacterium* включает более 10 видов, изолированных из ротовой полости человека и животных. Фузобактерии – грамтрицательные анаэробные палочки, неодинаковые по размеру и форме, особенно в патологическом материале, где они могут выглядеть как кокки, палочки, длинные нити. В культуре выглядят как прямые или искривленные палочки, короткие нити с заостренными концами, напоминающие веретено.

Лептотрихии (род *Leptotrichia*) имеют вид длинных нитей разной толщины с заостренными или вздутыми концами, дают густые сплетения, могут располагаться попарно в виде зернистых палочек.

Актиномицеты (*Actinomyces*) относятся к порядку *Actinomycetales*. Клетки актиномицетов обычно имеют вид длинных и ветвящихся нитей, напоминающих в ряде случаев мицелий одноклеточных грибов, но встречаются также палочковидные и кокковидные формы. Нити мицелия имеют длину 100–600 мкм и толщину 0,2–1,2 мкм. Актиномицеты размножаются спорами, поперечным делением и почкованием. Они не имеют выраженной капсулы, споры и ворсинок. Окраска по Граму – положительная.

Вопросы к лабораторной работе № 1

1. Какая наука называется микробиологией, ее задачи, методы, разделы? Основные этапы развития микробиологии.
2. Какие основные правила техники безопасности следует соблюдать при работе с микроорганизмами?
3. Какие виды оборудования, применяемого в микробиологической лаборатории вам известны?
4. Какие правила и приемы следует соблюдать при работе с микроорганизмами?
5. Какая техника приготовления препаратов применяется для изучения живых культур микроорганизмов?
6. Какие методики приготовления препаратов «висячая» и «раздавленная» капля вы использовали?
7. Какие основные морфологические формы бактерий вы изучали? Использование каких морфологических характеристик пригодилось в идентификации микроорганизмов? Как выглядит система классификации микроорганизмов по Берджи?
8. Какое значение для организма имеет микрофлора человека? Понятие об автохтонных, аллохтонных микроорганизмах.

Учебная карта к лабораторной работе № 1

1. Ознакомиться с техникой безопасности при работе в микробиологической лаборатории. Законспектировать основные положения техники безопасности в тетрадь.

2. Ознакомиться с оборудованием микробиологической лаборатории и заполнить табл. 1.

Таблица 1

Оборудование учебной микробиологической лаборатории

Основное оборудование учебной микробиологической лаборатории	Назначение, схематичное изображение
1	

3. Освоить приготовление препаратов «висячая» и «раздавленная» капля из чистых культур микроорганизмов. Законспектировать (кратко) методику получения препаратов «висячая» и «раздавленная» капля. Получить по два препарата «висячая» и «раздавленная» капля для различных морфологических форм из чистых культур микроорганизмов (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Tetracoccus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* и др.).

4. В приготовленных препаратах «висячая» и «раздавленная» капля изучить морфологию клеток, зарисовать форму и пространственное расположение клеток. На основании наблюдений заполнить табл. 2.

Таблица 2

Морфология бактериальных клеток

Культура	Препарат	Морфологическое описание	Схематическое изображение (рисунок)

5. Приготовить препараты «раздавленная капля», взяв мазки из зубодесневого кармана и с языка. Изучить морфологию клеток и заполнить табл. 3.

Таблица 3

Морфология микроорганизмов ротовой полости

Мазок	Морфологическое описание наблюдаемых микроорганизмов	Схематическое изображение (рисунок)
Из зубодесневого кармана		
С языка		

Сделать выводы о морфологических формах изученных микроорганизмов, о качественном составе микрофлоры ротовой полости.

Приложение к лабораторной работе № 1

Микроорганизмы	В слюне		Частота обнаружения в зубодесневых карманах, %
	Частота обнаружения, %	Количество в 1 мл	
Резидентная флора			
<i>Аэробы и факультативные анаэробы</i>			
<i>S. mutans</i>	100	$1,5 \times 10^5$	100
<i>S. salivarius</i>	100	10^7	100
<i>S. mitis</i>	100	$10^6 - 10^8$	100
Сапрофитные нейссерии	100	$10^5 - 10^7$	++
Лактобактерии	90	$10^3 - 10^4$	+
Стафилококки	80	$10^3 - 10^4$	++
Дифтероиды	80	Не определено	+
Гемофилы	60	Не определено	0
Пневмококки	60	Не определено	Не определено
Другие кокки	30	$10^2 - 10^4$	++
Сапрофитные микобактерии	++	Не определено	++
Тетракокки	++	Не определено	++
Дрожжеподобные грибы	50	$10^2 - 10^3$	+
Микоплазмы	50	$10^2 - 10^3$	Не определено
<i>Облигатные анаэробы</i>			
Вейллонеллы	100	$10^6 - 10^8$	100
Анаэробные стрептококки	100	Не определено	100
Бактероиды	100	Не определено	100
Фузобактерии	75	$10^2 - 10^3$	100
Нитевидные бактерии	100	$10^2 - 10^4$	100
Актиномицеты и анаэробные дифтероиды	100	Не определено	++
Спириллы и вибрионы	++	Не определено	++

Продолжение

Микроорганизмы	В слюне		Частота обнаружения в зубодесневых карманах, %
	Частота обнаружения, %	Количество в 1 мл	
Спирохеты (сапрофитные боррелии, трепонемы и лептоспиры)	+	Не определено	100
Непостоянная (транзиторная) флора			
<i>Аэробы и факультативные анаэробы</i>			
<i>Грамотрицательные палочки</i>			
<i>Klebsiella</i>	15	10–10 ²	0
<i>Escherichia</i>	2	10–10 ²	±
<i>Aerobacter</i>	3	10–10 ²	0
<i>Pseudomonas</i>	±	Не определено	0
<i>Proteus</i>	±	Не определено	0
<i>Alkaligenes</i>	±	Не определено	0
Бациллы	+	Не определено	0
<i>Облигатные анаэробы</i>			
<i>Клостридии:</i>			
<i>Clostridium putridum</i>	±	Не определено	0

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Приготовление фиксированных микробиологических препаратов. Методы исследования органоидов, структурных элементов и включений

Цель занятия: овладеть методиками фиксации и окраски микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Посевы микроорганизмов на чашках Петри, в пробирках со скошенным агаром, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов, реактив Никифорова.

Задачи:

1. Ознакомиться с основными органоидами и включениями микроорганизмов.
2. Освоить методы фиксации и окраски мазков.
3. Освоить методику окраски бактерий по методу Грама.
4. Освоить методы выявления спор, капсул и включений у бактерий.

Задание 1. Ознакомиться с основными органоидами и включениями микроорганизмов

Обязательными органоидами бактериальной клетки являются ядерный аппарат, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана.

Необязательными структурными элементами являются клеточная стенка, капсула, споры, пили, жгутики.

В центре бактериальной клетки находится **нуклеоид** – ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.

Цитоплазма – сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютинина, гликогена, гранулезы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидное ДНК), мезосомы (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

Цитоплазматическая мембрана ограничивает с наружной стороны цитоплазму, выполняет ряд важнейших функций – барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы – дыхательные, окислительно-восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

Клеточная стенка – присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других, не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий. Основное химическое соединение клеточной стенки, которое специфично только для бактерий – *пептидогликан* (муреиновые кислоты). От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий –

отношение к окраске по Граму. В соответствии с ним выделяют две большие группы – грамположительные («грам +») и грамотрицательные («грам –») бактерии (рис. 8).

Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму и последующем промывании этанолом сохраняет комплекс йода с генцианвиолетом и магниевыми солями рибонуклеиновых кислот (окрашены в сине-фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет за счет докрасивания фуксином.

Клеточная стенка грамположительных бактерий – мощная, толстая, несложно организованная, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, нет липополисахаридов, часто нет диаминопимелиновой кислоты.

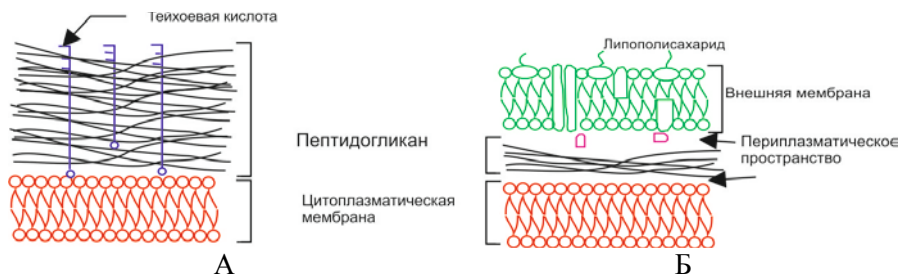


Рис. 8. Структура клеточной стенки Gr^+ (А) и Gr^- (Б) бактерий

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, содержит ЛПС, липопротейны, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно, имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная.

При обработке грамположительных бактерий ферментами, разрушающими пептидогликан, возникают полностью лишённые клеточной стенки структуры – **протопласты**. Обработка грамотрицательных бактерий лизоцимом разрушает только слой пептидогликана, не разрушая полностью внешней мембраны; такие структуры называют **сферопластами**. Протопласты и сферопласты имеют сферическую форму (это свойство связано с осмотическим давлением и характерно для всех безклеточных форм бактерий).

К **поверхностным структурам бактерий** (необязательным, как и клеточная стенка) относятся капсула, жгутики, микроворсинки.

Капсула или слизистый слой окружает оболочку ряда бактерий. Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микроорганизмов – фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций – распознавание и поглощение. У сапрофитов капсулы образуются во внешней среде, у патогенов – чаще в организме хозяина. Существует ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава. Капсула чаще состоит из полисахаридов, реже – из полипептидов.

Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие (передвигаются за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (флагеллиновых по химическому составу) образований – жгутиков).

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий:

- монотрихи – имеют один полярный жгутик;
- лофотрихи – имеют полярно расположенный пучок жгутиков;
- амфитрихи – имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам;
- перитрихи – имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Фимбрии или реснички – короткие нити, в большом количестве окружающие бактериальную клетку, с помощью которых бактерии прикрепляются к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек).

Пили первого типа – нити белковой природы, жесткие, закреплены в клеточной стенке. Способствуют адгезии микробных клеток на субстрате.

Пили второго типа имеют точно такое же строение, как и пили первого типа. Они обеспечивают конъюгацию у бактерий (F- пили – фактор фертильности), а также передают генетическую информацию от F+ к F- бактерии. Имеются только у F+ бактерий в небольшом количестве.

Пили третьего типа имеют очень большую длину. На этих пиялях адсорбируются бактериофаги. Они участвуют в процессах лизиса бактерий и передачи генетической информации.

Эндоспоры и спорообразование. Спороброобразование – способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. Эндоспоры образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчиво-

стью (резистентностью) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных воздействий окружающей среды. Высокая резистентность связана с большим содержанием кальциевой соли дипиколиновой кислоты в оболочке спор. Расположение и размеры спор у различных микроорганизмов отличаются тем, что имеет дифференциально-диагностическое (таксономическое) значение. Основные фазы «жизненного цикла» спор – споруляция (включает подготовительную стадию, стадию предспоры, образования оболочки, созревания и покоя) и прорастание, заканчивающееся образованием вегетативной формы. Процесс спорообразования генетически обусловлен.

У многих микроорганизмов, выращенных в результате обменных процессов в цитоплазме, образуются включения. К ним относятся отложения жира, полиоксимасляной кислоты, волютина (полифосфатов), крахмалоподобных полисахаридов (гликогена, гранулезы), серы и других веществ.

Задание 2. Освоить методы фиксации и окраски мазков

Для количественного учета, изучения морфологии, выявления структурных элементов, органоидов, внутриклеточных включений мазок бактериальной культуры необходимо зафиксировать и окрасить.

Этапы приготовления мазка:

1. Нанесение микробной культуры.
2. Высушивание.
3. Фиксация.
4. Окрашивание.

Мазок готовят на обезжиренном чистом предметном стекле, куда наносят небольшую каплю воды. В этой капле эмульгируют исследуемый материал, который распределяют тонким слоем на поверхности около 2 см². Если микроорганизмы выращены на жидкой питательной среде, то культуру берут петлей или стерильной пипеткой и каплю наносят непосредственно на стекло (без воды). После этого мазок высушивают на воздухе и фиксируют.

Методы фиксации:

- ✓ Физический – над пламенем спиртовки.
- ✓ Химический – в растворах спирта, ацетона, смеси Никифорова, формалина.

Фиксацию мазка над пламенем спиртовки производят в течение нескольких секунд мазком вверх. Эту операцию проводят достаточно быстро после полного высушивания мазка, не перегревая его (прикла-

дывание предметного стекла к тыльной стороне ладони должно вызывать чувство выраженного тепла, но не жжения).

Цели фиксации:

- ✓ Обеззараживание патогенных микроорганизмов.
- ✓ Закрепление клеток на стекле.
- ✓ Убитые микроорганизмы лучше воспринимают красители.

Методы окраски. Различают простые и сложные методы окраски мазков. При простых методах окраски мазок окрашивают каким-либо одним красителем, используя красители анилинового ряда. Если красящий ион (хромофор) – катион, то краситель обладает основными свойствами, если хромофор – анион, то краситель имеет кислые свойства. Кислые красители – эритрозин, кислый фуксин, зозин. Основные красители – генцианвиолет, кристаллический фиолетовый, метиленовый синий, основной фуксин. Преимущественно для окраски микроорганизмов используются основные красители, которые более интенсивно связываются кислыми компонентами клетки.

Микроорганизмы окрашивают, нанося краситель на полоску фильтровальной бумаги, находящейся на поверхности мазка.

Задание 3. Освоить методику окраски бактерий по методу Грама

Окраска бактерий по методу Грама:

1. Нанести каплю воды на прямое предметное стекло.
2. В каплю воды поместить бактериальную культуру.
3. Мазок высушить и зафиксировать над пламенем спиртовки.
4. На фиксированный мазок поместить полоску фильтровальной бумаги.
5. На полоску фильтровальной бумаги нанести генцианвиолет на 1–2 мин.
6. Фильтровальную бумагу удалить, краску слить и нанести раствор Люголя дважды: 1 раз – для того, чтобы смыть остатки красителя с мазка (при этом раствор не задерживают на мазке, а сразу же при легком покачивании сливают), 2 раз – на 2 мин (до почернения мазка).
7. Раствор Люголя слить и на мазок нанести 96 %-ный спирт на 15–20 с в зависимости от толщины мазка, пока мазок не станет серо-стального цвета.
8. Мазок промыть дистиллированной водой.
9. Мазок дополнительно окрасить фуксином Циля на 2–3 мин (воспользовавшись полоской фильтровальной бумаги).

10. Краситель смыть водой, препарат высушить, промикроскопировать.

Грамположительные (Гр+) бактерии окрашиваются в синефиолетовый цвет.

Грамотрицательные (Гр-) бактерии окрашиваются в красный (розовый) цвет.

Задание 4. Освоить методы выявления спор, капсул и включений у бактерий

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочкой для окраски спор применяют сначала химические вещества, меняющие структуру оболочки. Все способы окраски спор построены на едином принципе: сначала споры протравливаются различными веществами (хромовой, соляной, серной кислотами), окрашивают клетку со спорой при нагревании, затем обесцвечивают цитоплазму и дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

Окраска спор по способу Ауэски:

1. На приготовленный высушенный мазок наливают 1–2 %-ный раствор соляной кислоты и подогревают на пламени до отхождения паров (3–4 раза).

2. Промыть водой, высушить, фиксировать над пламенем.

3. Окрасить через фильтровальную бумагу раствором фуксина при нагревании (до появления паров) в течение 3–5 мин.

4. Препарат обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты в течение нескольких секунд (16–18 с) (до бледно-розовой окраски), медленно считая от 21 до 40.

5. Промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим в течение 2 мин.

6. Промывают водой и высушивают.

7. При микроскопии видны споры (красные) и вегетативные клетки (синие).

В связи с тем, что капсулы не окрашиваются подавляющим большинством красителей, для их выявления используют негативные препараты, в которых на окрашенном фоне можно наблюдать неокрашенные капсулы вокруг клеток.

Методика окраски капсул в негативном препарате (рис. 9):

а) нанести на предметное стекло немного культуры (1) и каплю туши (2) на расстоянии примерно одной трети от края;

б) правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу слева от капель под углом 45° ;

в) продвигают шлифованное стекло вправо до соприкосновения с каплей;

г) затем быстрым движением справа налево делают мазок. Капля должна быть небольшой и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1–1,5 см до его края;

д) нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана. Мазок высушить на воздухе и микроскопировать.

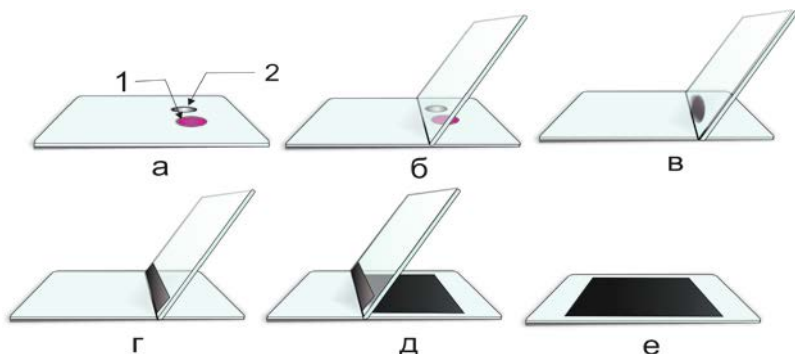


Рис. 9. Подготовка мазка

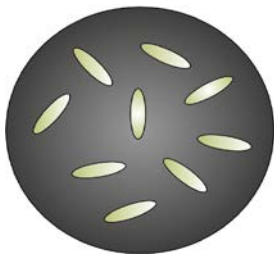
Обнаружение капсул по методу Бурри–Гинса (рис. 10):

1. Приготовить мазок на предметном стекле по методу Бурри.
2. Высушить на воздухе.
3. Фиксировать со смесью Никифорова (спирт и эфир 1:1) на 15–20 мин.
4. Осторожно промыть водой.
5. На мазок нанести фуксин на 3–5 мин.
6. Промыть водой.
7. Высушить на воздухе.
8. Микроскопия с иммерсией.

Внимание! Фильтровальной бумагой не пользоваться, чтобы не повредить препарат.

Препарат по Бурри–Гинсу: фон черный, клетки бактерий красные, капсулы неокрашенные (не воспринимают краситель).

Окраска по Бурри



Окраска по Бурри-Гинсу

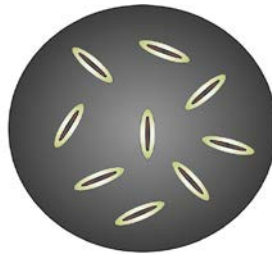


Рис. 10. Препараты для обнаружения капсул у бактерий под микроскопом

Окраска волютина по методу Омелянского:

1. Тонкий мазок культуры микроорганизмов высушивают на воздухе, фиксируют на пламени.
2. Окрашивают мазок через полоску фильтровальной бумаги фуксином Циля в течение 30 с. Промывают водой.
3. Обесцвечивают 30 с 1 %-ной серной кислотой и немедленно промывают водой. При этом серная кислота обесцвечивает цитоплазму, а зерна волютина остаются окрашенными фуксином.
4. Препарат докрашивают раствором метиленового синего в течение 20–30 с, промывают водой, высушивают и микроскопируют. На препарате видны гранулы волютина, окрашенные в красный цвет, на фоне цитоплазмы клеток, окрашенных в голубой.

Методика окраски включений гликогена:

1. Готовят мазок, сушат на воздухе, фиксируют раствором Никифорова в течение 5 мин.
2. Мазок окрашивают раствором Люголя в течение 1–2 мин. Промывают водой, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсией. Гранулы гликогена окрашиваются в красновато-коричневый цвет. Если препарат нагреть до 60 °С, окраска гликогена исчезает, а при охлаждении препарата восстанавливается.

Методика окраски включений гранулезы:

1. На предметное стекло наносят каплю исследуемого материала, добавляют каплю раствора Люголя.
2. Препарат закрывают покровным стеклом и микроскопируют. Включения гранулезы окрашиваются в серо-синий цвет.

Вопросы к лабораторной работе № 2

1. В чем различия в строении клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий?

2. В чем состоит теоретическая основа метода окраски бактерий по Граму?

3. В чем состоит основа методов выявления спор у бактерий?

4. Какие включения характерны для бактерий?

Учебная карта к лабораторной работе № 2

1. Ознакомиться со строением клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Изучить теоретические основы метода Грама.

2. Подготовить препараты бактерий и окрасить по методу Грама. Промикроскопировать. Результаты занести в табл. 1.

Таблица 1

Окраска по методу Грама

Бактериальная культура	Внешний вид препарата при микроскопировании	Результат по Граму
1		
2		
3		
4		

3. Приготовить препараты бацилл и провести окрашивание с целью выявления спор. Промикроскопировать. Результаты занести в табл. 2.

Таблица 2

Выявление спорообразования

Культура бактерий	Внешний вид препарата при микроскопировании	Результат анализа (споры выявлены/ не выявлены)
1		
2		

4. Приготовить препараты бацилл и провести окрашивание с целью выявления гликогена. Промикроскопировать. Результаты занести в табл. 3.

Таблица 3

Выявление гликогена

Культура бактерий	Внешний вид препарата при микроскопировании	Результат анализа (гликоген выявлен/ не выявлен)
-------------------	---	--

5. Сделать обобщающий вывод по результатам исследования морфологии изученных микроорганизмов.

Приложение к лабораторной работе № 2

Правила иммерсионной микроскопии:

1. Микроскоп устанавливают в рабочее положение.
2. Устанавливают освещение, включая лампу и направляя свет на вогнутое зеркало микроскопа. Конденсор должен быть поднят до упора, диафрагма открыта. При правильной установке освещения поле зрения микроскопа имеет форму круга, хорошо и равномерно освещенного.
3. На препарат наносят каплю иммерсионного масла.
4. Препарат помещают на предметный столик и фиксируют его клеммами.
5. Наблюдая сбоку, опускают тубус с объективом 90х, макровинтами в масло почти до соприкосновения с препаратом.
6. Затем, глядя в окуляр, макровинтом очень медленно поднимают объектив до появления изображения и с помощью микровинта производят окончательную фокусировку четкого изображения.
7. При микроскопии определяют взаимное расположение микроорганизмов, их размеры, форму, структуру и окраску.
8. После просмотра препарата револьвер переводят на малое увеличение 8х и только после этого препарат снимают со столика.
9. Фронтальную линзу объектива протирают марлей, смоченной чистым бензином или эфиром для удаления остатков иммерсионного масла.
10. Затем опускают предметный столик (или конденсор в микроскопах с неподвижным столиком) и накрывают микроскоп чехлом.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Молочнокислородное брожение бактерий

Цель занятия: изучить свойства микроорганизмов, осуществляющих молочнокислородное брожение.

Материалы и оборудование. Молочнокислородные продукты, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов, реактив Никифорова.

Задачи:

1. Ознакомиться с основными видами микроорганизмов, осуществляющими молочнокислое брожение.
2. Изучить состав микроорганизмов молочнокислых продуктов.

Задание 1. Ознакомиться с основными типами молочнокислого брожения и микроорганизмами, осуществляющими молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение – процесс анаэробного окисления углеводов, конечным продуктом которого является молочная кислота.

Молочнокислые бактерии относятся к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Хотя эта группа морфологически гетерогенна (включает длинные и короткие палочки, кокки), в физиологическом отношении ее можно охарактеризовать достаточно хорошо. Все относящиеся к ней бактерии грамположительны, не образуют спор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*) и в подавляющем большинстве неподвижны. Все они используют в качестве источника энергии углеводы и выделяют молочную кислоту. В отличие от *Enterobacteriaceae*, тоже образующих лактат, молочнокислые бактерии способны только к брожению; не содержат гемопroteинов (таких, как цитохромы и каталаза). Микроорганизмы рода *Lactobacteriaceae* являются факультативными анаэробами, они могут расти в присутствии кислорода воздуха (аэротолерантность).

Отличительный признак молочнокислых бактерий – это их потребность в ростовых веществах. Молочнокислые бактерии являются **ауксотрофами**, большинство из них нуждается в ряде витаминов и аминокислот, а также в пуринах и пиримидинах. С другой стороны, многие из них обладают способностью, которой нет у большинства микроорганизмов: они могут утилизировать молочный сахар (лактозу).

Распространение молочнокислых бактерий в природе определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способами получения энергии (брожение). Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

- а) в молоке, местах его переработки и молочных продуктах (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*, *S. diacetylactis*);
- б) на растениях и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbriickii*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*);

в) в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium* и др.).

Благодаря образованию больших количеств молочной кислоты, к которой сами они в значительной степени толерантны, молочнокислые бактерии при подходящих условиях могут довольно быстро размножаться, вытесняя другие микроорганизмы. По этой причине их легко культивировать на элективных средах и легко выделять. Естественные накопительные культуры этих бактерий содержатся в кислом молоке и молочных продуктах, кислом тесте, кислой капусте, силосе и т. п.

Различают **гомоферментативное** и **гетероферментативное** молочнокислое брожение, в зависимости от выделяющихся продуктов (помимо молочной кислоты) и их процентного соотношения. Отличие также заключается и в разных путях получения пирувата при деградации углеводов гомо- и гетероферментативными молочнокислыми бактериями.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. При гомоферментативном молочнокислом брожении углеводов сначала окисляется до пирувата по гликолитическому пути, затем пируват восстанавливается до молочной кислоты при помощи лактатдегидрогеназы. Продуктом гомоферментативного молочнокислого брожения является молочная кислота, которая составляет не менее 90 % всех продуктов брожения. Примеры гомоферментативных молочнокислых бактерий: *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus lactis* (табл. 1).

Таблица 1

Молчнокислые бактерии, сгруппированные по форме клеток и по типу брожения

Кокки	Палочки
Гомоферментативное брожение: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3-C(=O)-COOH$	
<i>Streptococcus lactis</i>	Термобактерии (температурный оптимум 40 °С, при 15 °С не растут)
<i>S. faecalis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>S. cremoris</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>S. thermophilus</i>	Стрептобактерии (температурный оптимум 30–37 °С; при 15 °С растут)
<i>S. diacetylactis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	<i>L. plantarum</i>
	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>

Кокки	Палочки
Гетероферментативное брожение: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-CHOH-COOH + CH_3-CH_2OH + CO_2$ (или CH_3-COOH)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. cremoris</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

Гетероферментативное молочнокислое брожение. В отличие от гомоферментативного брожения, деградация глюкозы идет по пентозофосфатному пути, образующийся из ксилулозо-5-фосфата глицеральдегид-3-фосфат окисляется до молочной кислоты, а ацетилфосфат восстанавливается до этанола (некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии окисляют полученный этанол частично или полностью до ацетата). Таким образом, при гетероферментативном молочнокислом брожении образуется больше продуктов: молочная кислота, уксусная кислота, этанол, двуокись углерода. Примеры гетероферментативных молочнокислых бактерий: *L. fermentum*, *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*.

На молочнокислом брожении основано получение многих пищевых продуктов, а также производство силоса для нужд животноводства.

Приготовление силоса. Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при запасании впрок кормов для скота. Для приготовления силоса используют листья сахарной свеклы, кукурузу, картофель, травы и люцерну. Растительную массу прессуют и прибавляют к ней мелассу, чтобы повысить отношение C/N, муравьиновую или какую-либо неорганическую кислоту, чтобы заранее обеспечить преимущественный рост лактобацилл и стрептококков. В таких условиях происходит контролируемое молочнокислое брожение.

Приготовление кислой капусты. Кислая капуста тоже представляет собой продукт, в приготовлении которого участвуют молочнокислые бактерии. В мелко нарезанной, посыпанной солью (2–3 %) и спрессованной белокочанной капусте при исключении доступа воздуха начинается молочнокислое брожение, в котором принимает участие сначала *Leuconostoc* (с образованием CO_2), а позднее *Lactobacillus plantarum*.

Молочные продукты. Молочнокислые бактерии, образующие кислоту и придающие продуктам определенный вкус, находят широкое применение в молочной промышленности. Стерилизованное или пастеризованное молоко или же сливки сбраживают, прибавляя в ка-

честве закваски чистые («стартовые») культуры молочнокислых бактерий (табл. 2).

Таблица 2

Молочнокислые продукты и соответствующие микробные закваски

Молочный продукт	Культура, входящая в состав закваски	Температура инкубации, °С	Продолжительность инкубации, ч
Сметана, пахта	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	22	18
Йогурт	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	43–45	2,5–3
Простокваша	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i>	30–35	6–8
Простокваша Мечниковская	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>S.diacetilactis</i> <i>S.cremoris</i>	40–45	3–5
Кефир, кумыс	<i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Streptococcus</i> дрожжи <i>Saccharomyces lactis</i> и рода <i>Torulopsis</i> , уксуснокислые бактерии	15–22	24–36
Творог	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S.cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	22 (35)	18 (5)
Ряженка	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	40–45	2,5–3

Йогурт получают из пастеризованного гомогенизированного цельного молока, инокулированного *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (после внесения закваски молоко выдерживают 2–3 ч при 43–45 °С). Под названием биоурт в про-

дажу поступает кислое молоко, сквашенное *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*. Закваску кефира готовят на так называемых «кефирных зернах», которые состоят из не полностью изученного сообщества организмов, включающего лактобациллы, стрептококки, микрококки и дрожжи.

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий впервые описаны И. И. Мечниковым. В настоящее время широко используется понятие «**пробиотик**» для обозначения живых микроорганизмов (преимущественно молочнокислых бактерий), употребление которых с пищей в достаточных количествах оказывает благоприятное действие на здоровье. В составе пробиотических кисломолочных продуктов активно используются бифидобактерии.

Бифидобактерии – это облигатная и доминирующая часть кишечной микрофлоры здорового человека и теплокровных животных. Она проявляет антагонистическую активность по отношению к патогенным, условно-патогенным и нежелательным микроорганизмам в кишечнике.

В настоящее время идентифицировано 24 вида бифидобактерий (лат. *bifidus* – раздвоенный, расщепленный надвое), объединенных в род *Bifidobacterium*.

Наиболее изученными видами бифидобактерий являются: *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum* и др. Типовой вид – *B. bifidum*.

Морфология бифидобактерий. Бифидобактерии представляют собой чрезвычайно вариабельные по форме палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные Y- или V-формы, булабовидные, лопатовидные. Клетки располагаются одиночно, парами, иногда цепочками или розетками, размер клеток 0,5–1,3×1,5–8 мкм. Грамположительные не образуют спор и капсул, неподвижные. Микроскопическая картина каждого вида бифидобактерий имеет особенности по размеру, форме и расположению клеток.

При выращивании культур бифидобактерий на печеночном агаре или в молоке ветвление исчезает, клетки становятся грамвариабельными, слабее окрашиваются кислыми и щелочными красителями, появляется много гранулированных форм, которые иногда можно принять за кокки. Грануляция у бифидобактерий наблюдается также в средах с высоким содержанием сухих веществ.

В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. У них не обнаружено казеолитической активности, то есть

они могут усваивать казеин только после частичного гидролиза. В результате расщепления казеина образуются полипептиды, гликопептиды, аминоксахара, стимулирующие рост бифидобактерий. Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулируют экстракты дрожжей, гидролизованное молоко, а также увеличение соотношения – белок:лактоза.

Задание 2. Изучить состав микроорганизмов молочнокислых продуктов

Приготовить, окрасить и промикроскопировать мазки из молочнокислых продуктов.

На предметных стеклах приготовить тонкие препараты – мазки молочнокислых продуктов, подсушить их на воздухе, а затем нанести несколько раз смесь Никифорова. Последнюю порцию смеси оставить на препарате до высыхания. Фиксированные мазки окрасить метиленовой синью Леффлера в течение 3–5 мин, промыть водой, просушить фильтровальной бумагой и микроскопировать.

Для выявления микроорганизмов рода *Leuconostoc* провести исследование по методу Бурри–Гинса.

Выявление капсулообразования по методу Бурри–Гинса (модифицированная):

1. На предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина, в которую с помощью стерильной петли вносят исследуемую культуру бактерий.

2. Рядом с первой каплей помещают каплю туши. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу слева от капель под углом 45°.

3. Продвигают шлифованное стекло вправо до соприкосновения с каплей.

4. Затем быстрым движением справа налево делают мазок. Капля должна быть небольшой и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1–1,5 см до его края. Нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана.

5. Мазок высушивают на воздухе.

6. Микроскопируют. На темно-дымчатом фоне препарата видны розовые клетки микроорганизмов, окруженные бесцветной капсулой.

Выявление молочной кислоты, образовавшейся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий путем качественной реакции Уффельмана. В 2 пробирки внести по 10 мл 5 %-ного раствора фенола и прибавить несколько капель слабого раствора хлорного железа. Получается интенсивно-синий раствор хлорного железа. От прибавления нескольких капель продукта, содержащего мо-

лочную кислоту, в пробирку № 1 раствор становится желтоватым, тогда как в пробирке № 2, куда вносятся несколько капель воды, окраска раствора не меняется.

Исследование на наличие активности каталазы. Для выявления активности каталазы на предметное стекло наносят каплю 5 %-ного раствора перекиси водорода. В нее помещают бактериальной петлей каплю молочнокислого продукта и тщательно перемешивают. При наличии у микроорганизмов каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

Вопросы к лабораторной работе № 3

1. Гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение?
2. Микроорганизмы, осуществляющие молочнокислое брожение, их морфологические и биохимические свойства?
3. Состав заквасок основных молочнокислых продуктов?
4. Пробиотические свойства молочнокислых продуктов?

Учебная карта к лабораторной работе № 3

1. Ознакомиться с основными типами молочнокислого брожения и микроорганизмами, осуществляющими молочнокислое брожение.
2. Подготовить мазки из молочнокислых продуктов, окрасив их метиленовой синью Леффлера. Результаты занести в таблицу 1.

Таблица 1

Морфология микроорганизмов молочнокислого брожения

Молочнокислый продукт	Внешний вид препарата при микроскопировании	Вывод о предполагаемой таксономической принадлежности обнаруженных микроорганизмов
1		
2		

3. Провести исследование образцов сметаны и творога на наличие микроорганизмов рода *Leuconostoc*. Результаты занести в табл. 2.

Таблица 2

Обнаружение капсулообразующих микроорганизмов молочнокислого брожения

Молочнокислый продукт	Внешний вид препарата при микроскопировании	Результат анализа (капсулы выявлены/ не выявлены)
1		
2		

4. Провести реакцию Уффельмана на присутствие молочной кислоты.
5. Провести реакцию с перекисью водорода для выявления активности каталазы в молочнокислом продукте. Результаты занести в табл. 3.

Таблица 3

Определение активности каталазы

Молочнокислый продукт	Результат анализа (активность каталазы выявлена/не выявлена)

6. Сделать обобщающий вывод по результатам исследования изученных молочнокислых продуктов.

Приложение к лабораторной работе № 3

Таблица 4

Характеристика микроорганизмов молочнокислого брожения

Молочнокислые микроорганизмы	Наиболее распространенные виды	Энантиомер молочной кислоты	Морфологическая и биохимическая характеристика
Бактерии рода <i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrückii</i> <i>L. delbrückii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>	<i>L(S)</i> <i>D(R)</i> <i>R</i> <i>RS</i> <i>RS</i> <i>S</i>	Неспорообразующие грамположительные, неподвижные короткие или длинные, каталазоотрицательные палочки, делятся в одной плоскости, образуя пары или цепочки клеток
Слизеобразующие бактерии рода <i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> <i>L. lactis</i>	<i>R</i>	Грамположительные неспорообразующие, имеющие сферическую или овальную (чечевицеобразную) форму, располагающиеся попарно или цепочкой, окруженные капсулой, неподвижные каталазоотрицательные кокки
Стрептококки группы N рода <i>Streptococcus</i>	<i>S. faecalis</i> <i>S. lactis</i>	<i>R</i> <i>R</i>	Грамположительные, располагающиеся в виде коротких или длинных цепочек, неподвижные каталазоотрицательные, не дающие роста на в питательных средах с pH 9,6 и 6,5 % NaCl кокки

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Маслянокислое брожение бактерий

Цель занятия: изучить свойства микроорганизмов, осуществляющих маслянокислое брожение.

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, мел, большие пробирки, ватные пробки, резиновые пробки, пипетки, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов по методу Ауэски, 5 %-ный раствор хлорного железа, раствор Люголя.

Задачи:

1. Ознакомиться с основными видами микроорганизмов, осуществляющими маслянокислое брожение.
2. Получить накопительную культуру бактерий рода *Clostridium*, осуществляющих маслянокислое брожение.
3. Изучить морфологию бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение.

Задание 1. Ознакомиться с основными видами микроорганизмов, осуществляющими маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение – это процесс анаэробного разложения углеводов маслянокислыми бактериями с образованием масляной кислоты и других продуктов по уравнению:



Кроме масляной кислоты, в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при смещении реакции в кислую сторону (до pH 5,5) – в больших количествах бутиловый спирт и ацетон. Энергетическим материалом для маслянокислых бактерий служит крахмал, водорастворимые углеводы типа декстринов, ди- и моносахаридов, органические кислоты (молочная и пировиноградная) и спирты – маннит и глицерин. В качестве источника азота они используют самые различные азотистые соединения; пептон, аминокислоты, аммиачные соли, а некоторые даже атмосферный азот.

Бактерии, вызывающие маслянокислое брожение, относятся к роду *Clostridium*. Маслянокислые бактерии широко распространены в почве (до 90 % почвенных образцов, как правило, содержат эти бактерии), навозе, загрязненных водоемах, на разлагающихся растительных остатках, в молоке, на поверхности растений и т. д. В природе маслянокислые бактерии полезны. Образующаяся масляная кислота в невысоких

концентрация является веществом, стимулирующим рост высших растений. Маслянокислое брожение происходит в природных условиях в гигантских масштабах: на дне болот, в заболоченных почвах, илах и всех тех местах, куда ограничен доступ кислорода. Благодаря деятельности маслянокислых бактерий разлагаются огромные количества органического вещества. Однако маслянокислое брожение часто приносит значительный ущерб, вызывая массовую порчу овощей при хранении, вспучивание сыра, порчу консервов, прогоркание молока.

Clostridium spp. входят в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (автохтонная микрофлора); иногда их обнаруживают на коже и в полости рта (аллохтонная микрофлора). К роду *Clostridium* относятся также весьма опасные патогенные виды: *Clostridium tetani* – возбудитель столбняка, *Clostridium perfringens* – возбудитель газовой гангрены, *Clostridium botulinum* – продуцент экзотоксина, одного из самых сильных биологических ядов (ботулизм).

Все виды рода объединены в группы в зависимости от способности сбраживать те или иные органические соединения.

Первая группа – сахаролитические виды *Clostridium*, сбраживающие растворимые углеводы, крахмал или пектин с образованием бутирата, ацетата, CO_2 и H_2 . Брожение при участии некоторых микроорганизмов группы приводит к образованию из сахаров дополнительных нейтральных соединений (бутанола, пропанола, ацетона, небольших количеств этанола). В группу входят бактерии, вызывающие маслянокислое и ацетонобутиловое брожения: *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butylicum*, *C. acetobutylicum* и др.

Вторая группа – протеолитические виды *Clostridium*, сбраживающие аминокислоты. Обладают сильными протеолитическими свойствами и способны к интенсивному гидролизу белков с последующим сбраживанием аминокислот. Рост микроорганизмов средах с белком сопровождается образованием аммиака, CO_2 , H_2 , жирных кислот и большого количества летучих соединений с неприятным запахом. К группе относятся виды: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. botulinum* и др. Многие представители рода *Clostridium*, сбраживающие аминокислоты, способны также к сбраживанию углеводов.

Третья группа – виды *Clostridium*, сбраживающие азотсодержащие циклические соединения – пурины и пиримидины. Пурины (гуанин, гипоксантин, ксантин и др.) под влиянием *C. acidurici* и *C. cylindrosporum* превращаются в аммиак, ацетат и CO_2 . *C. oroticum* сбраживает пиримидины, при этом урацил распадается до аланина, CO_2 и NH_3 , а оротовая кислота – до уксусной кислоты, CO_2 и NH_3 .

Четвертая группа включает всего один вид – *C. kluuyveri*, сбраживающий смесь этанола с ацетатом до бутирата и капроновой кислоты, а также небольшого количества водорода.

Задание 2. Получить накопительную культуру бактерий рода *Clostridium*, осуществляющих маслянокислое брожение

Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий рода *Clostridium* проводят с использованием нечищенных клубней картофеля, на поверхности которых высока вероятность присутствия бактерий этого рода. Измельченные клубни помещают в водную среду, куда добавляют мел для создания нейтральной среды, так как маслянокислые бактерии относятся к нейтралофилам. Чтобы в этой среде развивались преимущественно маслянокислые бактерии, следует создать в ней строго анаэробные условия и подвергнуть среду пастеризации (прогреванию при температуре около 80 °С в течение 10–15 мин). При нагревании споры маслянокислых бактерий остаются жизнеспособными, а попавшие с почвой неспорообразующие бактерии погибают.

Задание 3. Изучить морфологию бактерий, осуществляющих маслянокислое брожение

В настоящее время среди представителей *Clostridium* насчитывается более 80 видов бактерий. Они являются строгими (облигатными) анаэробами, представляют собой подвижные крупные палочки (перитрихальный тип жгутикования) с кластридиальным или плектридиальным типом спорообразования (рис. 11). У видов рода образуются споры, имеющие овальную или сферическую форму; они терморезистентны. Окраска по Граму – положительная. Очень чувствительны к кислотности среды, оптимум рН 6,9–7,3. При рН ниже 4,9 прекращают развиваться. Характерная особенность маслянокислых бактерий – способность накапливать в клетках гранулезу в период образования спор и перед ним.

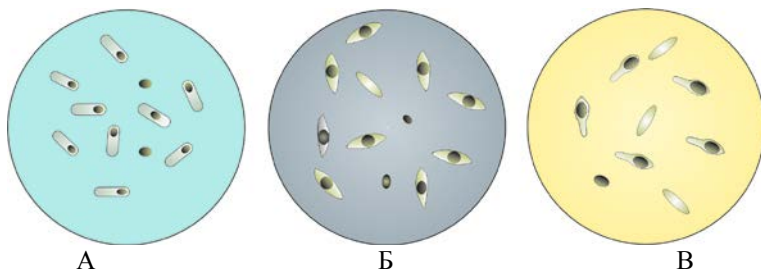


Рисунок 11 – Типы спорообразования у бактерий:
А – бациллярный, Б – кластридиальный, В – плектридиальный

Род включает психрофильные, мезофильные и термофильные виды. Температурный оптимум для роста большинства мезофильных видов лежит в диапазоне 30–40 °С. Для термофильных видов температурный оптимум составляет 60–75 °С. Оптимальная реакция среды для клостридий – нейтральная или слабощелочная. Типичный представитель маслянокислых бактерий – *Clostridium butyricum*. Это крупная палочка (1–2×10 мкм). Молодые клетки подвижны, на более поздних стадиях развития они теряют жгутики, приобретают веретенообразную форму и накапливают запасное питательное вещество – полисахарид гранулезу. При образовании спор клетки приобретают веретеновидную форму, иногда форму барабанной палочки.

Вопросы к лабораторной работе № 4

1. Какие виды маслянокислого брожения вам известны?
2. Какие микроорганизмы, осуществляющие маслянокислое брожение вы изучали, их морфологические и биохимические свойства?
3. Каким образом производится получение накопительной культуры маслянокислых бактерий рода *Clostridium*?
4. Как происходит спорообразование у бактерий рода *Clostridium*?

Учебная карта к лабораторной работе № 4

Получить накопительную культуру маслянокислых бактерий:

1. Неочищенный картофель нарезать ломтиками, которые могут легко войти в пробирку.
2. Заполнить ими пробирку на 1/3 объема, добавить щепотку мела и заполнить водой почти до верха. Закрывать ватной пробкой.
3. Пробирки поместить в водяную баню при температуре 80 °С на 10–15 мин.
4. Вынуть ватные пробки и быстро заменить их резиновыми, проводя последние через пламя спиртовки и обжигая край пробирок.
5. Затем пробирки закрыть пробками и ставить в термостат с температурой 35 °С на 2–3 дня.
6. При этих условиях в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Элективные условия для прохождения в опыте маслянокислого брожения:

1) наличие крахмала как специфического источника углерода, который используется только микроорганизмами, содержащими фермент амилазу, вызывающую гидролиз крахмала до глюкозы;

2) присутствие маслянокислых бацилл на поверхности картофеля;

- 3) анаэробные условия под высоким столбиком жидкости;
- 4) нейтральная среда за счет внесения мела;
- 5) пастеризация, позволяющая отделить маслянокислые бациллы от неспоровых форм.

Исследовать микроорганизмы маслянокислого брожения:

1. С помощью пипетки взять жидкость со дна пробирки, приготовить препарат «раздавленная капля» с добавлением раствора Люголя и «висячую каплю».

2. Культуру микроскопировать, в ней обнаруживается главным образом *Clostridium pasteurianum* – подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживается спора.

Исследовать спорообразование по Ауэски, результаты занести в табл. 1.

1. Сделать рисунок.
2. С культуральной жидкостью проводят качественную реакцию на масляную кислоту. Для этого к 5 мл жидкости добавляют 2 мл 5 %-ного хлорного железа. При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета.

Таблица 1

Морфология маслянокислых бактерий

Метод, использованный для изучения морфологии	Внешний вид препарата при микроскопировании
«Висячая капля»	
«Раздавленная капля» с раствором Люголя	
Метод Ауэски для выявления спорообразования	

Сделать обобщающий вывод по результатам исследования.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5
Микроорганизмы воздуха.
Культуральные свойства микроорганизмов

Цель занятия: изучить микроорганизмы воздуха, ознакомиться с методами их количественного определения; освоить методы определения культуральных свойств микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Атлас микроорганизмов, определитель Берджи, шкала цветов А. С. Бондарцева, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, чашки Петри стерильные, среда МПА стерильная, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов.

Задачи:

1. Ознакомиться с качественным составом микрофлоры воздуха и методами определения количественного состава микроорганизмов в воздухе.
2. Определить общее микробное число воздуха лабораторного помещения
3. Освоить методы определения культуральных свойств на примере микроорганизмов воздуха.

Задание 1. Ознакомиться с качественным составом микрофлоры воздуха и методами определения количественного состава микроорганизмов в воздухе

Воздух как среда обитания для микроорганизмов менее благоприятен, чем почва и вода, так как в нем не содержится или содержится очень мало питательных веществ, необходимых для размножения микроорганизмов. Кроме того, на них сильнее действуют такие неблагоприятные факторы, как высушивание и ультрафиолетовые лучи солнечного света. Тем не менее, попадая в воздух, многие микроорганизмы могут сохраняться в нем более или менее длительное время. Воздух особенно загрязнен вблизи земной поверхности, а с высотой он становится все более чистым. На степень загрязнения воздуха микробами влияют и климато-географические условия. Больше всего микроорганизмов в атмосфере содержится летом, меньше всего – зимой.

Микрофлору воздуха условно разделяют на **резидентную** (постоянно обнаруживаемую) и **временную** (обнаруживают спорадически).

В атмосферном воздухе в основном встречаются три группы микроорганизмов.

Пигментообразующие кокки в солнечные дни составляют до 70–80 % всей флоры (пигмент защищает бактерии от инсоляции): *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidam*, *M. lutea*, *Sarcina flava*, *S. alba*, *S. rosea*.

Почвенные споровые и гнилостные микроорганизмы. Их содержание резко увеличивается в сухую и ветреную погоду: *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, виды *Actinomyces*.

Плесневые грибы и дрожжи (роды *Penicillium*, *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Mucor* и др.). Их содержание увеличивается при повышении влажности воздуха.

Микрофлора воздуха закрытых помещений более однообразна и относительно стабильна. Среди микроорганизмов доминируют обитатели носоглотки человека, в том числе патогенные виды, попадающие в воздух при кашле, чихании или разговоре (стафилококки, в том числе, *Staphylococcus aureus*, стрептококки). Основным источником загрязнения воздуха патогенными видами – бактерионосителями. Уровень микробного загрязнения зависит, главным образом, от плотности заселения, активности движения людей, санитарного состояния помещения, в том числе пылевой загрязненности, вентиляции, частоты проветривания, способа уборки, степени освещенности и других условий. Так, регулярные проветривания и влажная уборка помещений снижает обсемененность воздуха в 30 раз (по сравнению с контрольными помещениями). Самоочищения воздуха закрытых помещений не происходит.

Условия циркуляции микроорганизмов в воздухе. Микроорганизмы в воздухе находятся в состоянии аэрозоля. Выделяют три основные фазы бактериального аэрозоля:

✓ **Капельная, или крупноядерная фаза** состоит из бактериальных клеток, окруженных водно-солевой оболочкой. Диаметр частиц около 0,1 мм и более. Частицы оседают довольно быстро: длительность пребывания в воздухе составляет несколько секунд, а скорость перемещения — в среднем 30 см/с.

✓ **Мелкоядерная фаза** образуется при высыхании частиц первой фазы и состоит из бактериальных клеток, сохранивших только химически связанную воду на своей поверхности и свободную воду внутри клеток. В этой фазе частицы имеют наименьшие размеры, легко перемещаются потоками воздуха, длительное время находятся в нем во взвешенном состоянии. Это наиболее устойчивая фаза, так как диаметр большинства частиц не превышает 0,05 мм, а скорость оседания частиц составляет в среднем 0,013 см/с. При этом скорость их передвижения превышает 30 см/с, поэтому они могут рассеиваться на большие расстояния. Эта фаза представляет наибольшую эпидемиологическую опасность, так как в ее составе распространяется большинство возбудителей воздушно-капельных инфекций, особенно малоустойчивых к внешним воздействиям (например, возбудитель коклюша).

✓ **Фаза «бактериальной пыли».** Из первых двух фаз бактерии могут переходить в состав более крупных частиц, оседающих в виде

пыли на различных предметах, образуя так называемую «бактериальную пыль». Ее важное свойство – способность легко диспергироваться под воздействием даже малых токов воздуха. Размер частиц варьирует от 0,01 до 1 мм. В зависимости от размера частиц и скорости воздушных течений, скорость их перемещения находится в пределах 0,5–30 см/с. Вследствие длительного пребывания во взвешенном состоянии и способности частиц проникать в дистальные отделы лёгких, мелкодисперсная «бактериальная пыль также представляет эпидемиологическую опасность. Эта фаза бактериального аэрозоля преобладает в воздухе жилых помещений и с ней рассеиваются патогенные микроорганизмы, устойчивые к высушиванию (микобактерии, клостридии, стафилококки, стрептококки, грибы).

При исследовании бактериальной загрязненности воздуха учитывается общее количество микроорганизмов, содержащихся в определенном объеме воздуха, и качественный состав микрофлоры воздуха.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха проводится с использованием двух методов отбора проб воздуха:

Седиментационный метод (по Коху) – оседание микроорганизмов под действием силы тяготения – является простым способом изучения микрофлоры воздуха. Он заключается в том, что чашки Петри со средой остаются открытыми на определенное время (5–10 мин на общую обсемененность и не менее 40 мин на кокковую микрофлору), затем их закрывают и выдерживают 24 часа при комнатной температуре.

Количество выросших колоний соответствует степени загрязненности воздуха и подчиняется правилу Омелянского: по приблизительному подсчету на площадь 100 см² в течение 5 мин оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Аспирационный метод основан на активном просасывании воздуха (этот метод дает возможность определить не только качественное, но и количественное содержание бактерий).

Индикаторные микроорганизмы санитарного состояния воздуха. К санитарно-показательным микроорганизмам воздуха относят золотистый стафилококк, стрептококки, грамотрицательные бактерии и грибы.

В воздухе больничных помещений доминируют золотистый стафилококк и стрептококки. Соотношение микроорганизмов составляет в среднем 70 и 30 % соответственно. При этом в 1 м³ воздуха операционных залов, послеоперационных палат, перевязочных, отделениях реанимации, родильных залов они должны отсутствовать.

Особый случай – воздух аптечных помещений, где из-за наличия антимикробных препаратов могут быстро погибать бактерии, но сохраняться грибы, поэтому их обязательно необходимо выявлять при исследовании воздуха аптек.

Дополнительные критерии. Как показатель запыленности и отсутствия влажной уборки расценивают присутствие спорообразующих палочек, а показателем повышенной влажности – плесневых грибов. Показатель плохой освещенности – отсутствие пигментообразующих форм бактерий.

Значительное содержание микробов в воздухе свидетельствует о низком санитарном состоянии помещения.

При наличии до 500 микробных клеток в 1 м³ воздуха жилых или производственных помещений воздух считают чистым.

Задание 2. Определить общее микробное число воздуха лабораторного помещения

Общее микробное число воздуха (ОМЧ) – количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха. Для определения общего количества бактерий в воздухе закрытых помещений забирают две пробы (объемом по 100 л каждая) на чашки Петри с МПА при помощи любого прибора (чаще всего аппарата Кротова), либо седиментационным методом. Чашки с посевом помещают в термостат на 24 ч, а затем на 48 ч оставляют при комнатной температуре. Экспозиция чашек с посевами на свету дает возможность подсчитать отдельно количество пигментных колоний (желтых, белых, розовых, черных, оранжевых и др.), количество спорообразующих бацилл, актиномицетов, грибов.

При определении микробного числа методом седиментации по Коху подсчитываются колонии, выросшие на МПА в чашках Петри, и расчет ведется по В. Л. Омелянскому. Формула для расчета общего микробного числа воздуха:

$$\text{ОМЧ} = \frac{N \times 100 \text{ см}^2 \times 5 \text{ мин}}{S - t},$$

где, N – число колоний, выросших на чашке Петри, S – площадь чашки ($S = \pi r^2$), см², t – время экспозиции чашки, мин.

Задание 3. Освоить методы определения культуральных свойств микроорганизмов воздуха

Изучение культуральных свойств бактерий – один из этапов работы по определению видовой принадлежности микроорганизмов.

Культуральные свойства микроорганизмов определяются характером роста их в плотных, жидких и полужидких питательных средах. Культуральные свойства характерны для каждого вида микроорганизмов и являются важным признаком. На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

1. **Форма колонии** (рис. 12).

2. **Размер (диаметр) колонии** – измеряют в мм, если размер колонии не превышает 1 мм, то ее называют точечной, 1–2 мм – мелкой, 2–4 мм – средней, 4–6 и более мм – крупной.

3. **Прозрачность**. Колонии могут быть прозрачными, пропускающими свет, и мутными, через которые не видны контуры предметов.

4. **Контур края** (рис. 13). Различают гладкий (S) и шероховатый (R) контур края.

5. **Рельеф колонии (профиль)** (рис. 14) характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или под лупой при рассматривании сверху и сбоку.

6. **Поверхность колонии** – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

7. **Цвет**. Для определения цвета колонии пользуются шкалой цветов А. С. Бондарцева. Особо отмечают выделение пигментов в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигментов в среду.

1. **Структура** (рис. 15). Структура колоний определяется в проходящем свете при слабо увеличении микроскопа. У пигментированных колоний она не определяется.

2. **Консистенция** колоний исследуется посредством прикосновения микробиологической петлей. По консистенции колонии бывают:

✓ пастообразные, легко снимающиеся и размазывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;

- ✓ вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- ✓ волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности плотной среды в виде упругой пленки, соответствующие величине и форме колонии;
- ✓ хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли;
- ✓ крошковатые;
- ✓ плотные, врастающие в среду.

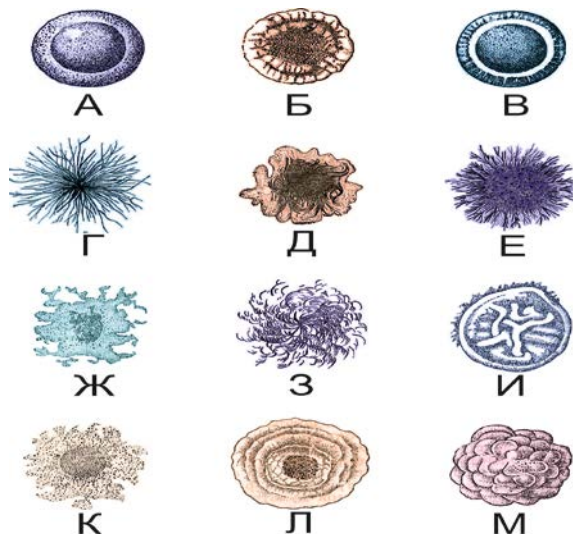


Рис. 12. Форма колоний:

А – круглая, Б – круглая с фестончатым краем, В – круглая с валиком по краю, Г, Д – ризоидная, Е – с ризоидным краем, Ж – амёбовидная, З – нитевидная, И – складчатая, К – неправильная, Л – концентрическая, М – сложная

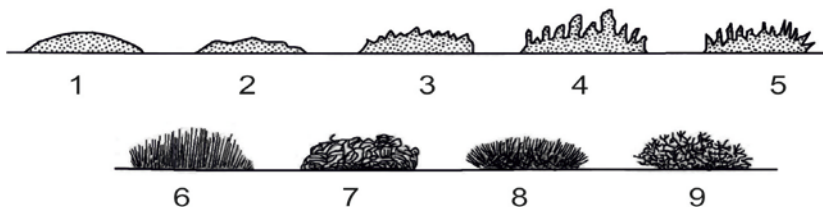


Рис. 13. Контур края:

1 – гладкий (S), 2 – волнистый, 3 – зубчатый, 4 – лопастной, 5 – неправильный, 6 – реснитчатый, 7 – нитчатый, 8 – ворсинчатый, 9 – ветвистый

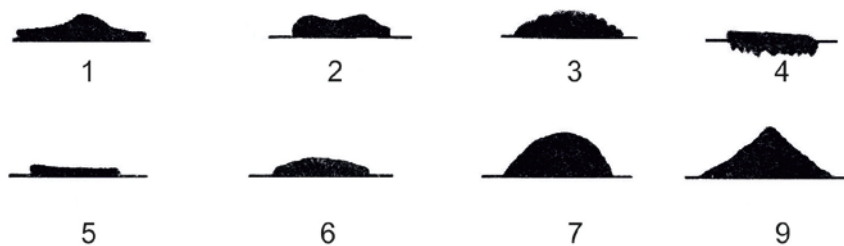


Рис. 14. Рельеф колонии (профиль):

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

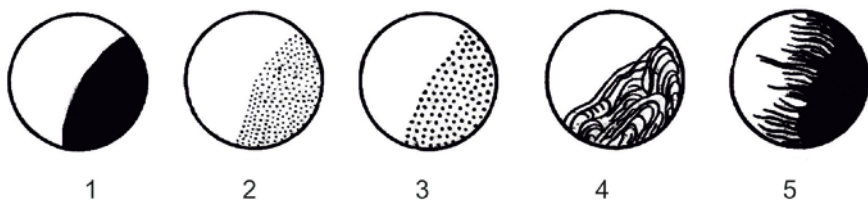


Рис. 15. Структура колоний:

1 – однородная, 2 – мелкозернистая, 3 – крупнозернистая, 4 – струйчатая, 5 – волокнистая

На жидких питательных средах выявляются следующие формы роста бактерий:

1. Рост бактерий с равномерным помутнением среды, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроорганизма. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

2. Придонный рост бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Придонный рост характерен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

3. Пристеночный рост бактерий выражается в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя более или менее крупные рыхлые хлопья или, наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности сосуда, с которой (в зависимости от вида) снимают легко или с трудом.

4. Поверхностный рост бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различными. Рост бактерий в виде поверхностно плавающей пленки характерен для микроорганизмов-аэрофилов.

Для выявления особенностей роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2–0,5 %-ного полужидкого агара для того, чтобы особенности роста проявлялись особенно четко, прокол среды делают в непосредственной близости к стенке пробирки. Посев, произведенный таким образом, дает возможность дифференцировать подвижные виды микроорганизмов от неподвижных.

Задание 4. Изучить культуральные свойства микроорганизмов воздуха

Среди микроорганизмов воздуха закрытых помещений наиболее часто при засеве на плотные среды обнаруживаются бактерии родов *Micrococcus* (*M. roseus*, *M. flavus*, *M. candidam*, *M. lutea*), *Sarcina* (*S. flava*, *S. alba*, *S. rosea*), *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mycoides*), *Actinomyces*, а также колонии грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Mucor* и др.

Бациллы образуют колонии, как правило, крупные, круглые, с неровными краями, сухие, морщинистые. Микрококки образуют круглые гладкие слегка блестящие, окрашенные колонии, пигменты которых не диффундируют в среду.

Актиномицеты образуют беловатые колонии, выросшие в агар. При описании актиномицетных колоний обычно отмечают наличие и цвет воздушного и субстратного мицелия, наличие растворимого пигмента, выделяемого в среду; консистенцию колоний; наличие складчатости колоний (концентрическая или радиальная); консистенцию воздушного мицелия (мучнистая, бархатистая, порошковидная, пушистая). Морфологические признаки актиномицетов – строение колоний и мицелия, его ветвление, строение и расположение спораносцев, наличие спорангиев, склероциев, количество спор в цепочках на субстратном и/или воздушном мицелии – изучают, просматривая колонии актиномицетов, выросшие на плотной питательной среде в чашках Петри, при малом увеличении микроскопа (рис. 16).

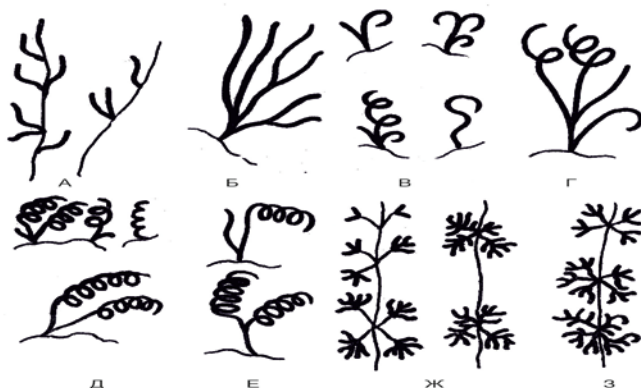


Рис. 16 – Форма и расположение спороносцев у актиномицетов:

а – прямые, короткие, б – прямые, длинные, разветвленные, в – короткие в виде крючков и коротких неправильных спиралей, г – длинные в виде крючков и неправильных спиралей, д – в виде правильных спиралей, е – с плотными сжатыми спиральями, ж – в мутовках прямые, з – в мутовках, имеют крючки, спирали в 1–1,5 оборота

Вопросы к лабораторной работе № 5

1. Каковы состав микрофлоры воздуха и санитарно-показательные микроорганизмы воздуха?
2. Какие методы определения общего микробного числа воздуха вами изучены? Правило В. Л. Омелянского.
3. Какие культуральные свойства бактерий вам известны?
4. Какие признаки используются при описании культуральных свойств микроорганизмов?
5. Какие характеристики культуральных свойств микроорганизмов воздуха вы изучали?

Учебная карта к лабораторной работе № 5

1. Осуществить посев микроорганизмов в стерильную чашку Петри на питательную среду (седиментационный метод (по Коху)). Следует помнить, что открывать чашки Петри необходимо только во время посева. Чашку помещают на рабочий стол на лист чистой бумаги. Крышку снимают и кладут рядом, не переворачивая. Продолжительность экспозиции составляет 10 мин. Контрольная чашка со средой не открывается. После посева чашки Петри подписать (фамилия студента, группа) и поставить на выращивание при комнатной температуре.

2. Подсчитать общее количество выросших колоний микроорганизмов на питательной среде в чашке Петри. Провести расчет ОМЧ в м³ воздуха. Заполнить таблицу 1.

Таблица 1

ОМЧ лабораторного помещения

Количество выросших колоний микроорганизмов на чашке Петри	Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см ²	ОМЧ

3. Произвести исследование культуральных свойств колоний, выросших на чашке Петри, выбрав 5 типовых колоний. Заполнить табл. 2.

4. Затем из каждой типовой колонии сделать мазок и окрасить по Граму. В препарате изучить форму клеток и их расположение в пространстве. Занести данные в табл. 2.

Таблица 2

Культуральные и морфологические свойства микроорганизмов воздуха лабораторного помещения

Типовая колония	1	2	3	4	5
Количество однотипных колоний					
Культуральные свойства					
Форма колонии					
Размер (диаметр) колонии					
Прозрачность					
Контур края					
Рельеф колонии (профиль)					
Поверхность					
Цвет					
Структура					
Консистенция					
Морфологические свойства					
Форма клеток					
Расположение в пространстве					
Окраска по Граму					

Воспользовавшись материалом атласа микроорганизмов, учебно-методических материалов к лабораторной работе № 5, определителя Берджи, сделать предварительный вывод о таксономической принадлежности изученных микроорганизмов воздуха.

Сделать вывод о санитарном состоянии лабораторного помещения.

Приложение к лабораторной работе № 5

Таблица 1

*Критерии для санитарной оценки воздуха помещений
различного назначения*

Оценка воздуха	ОМЧ
В жилых помещениях	до 1500
В аптеках: асептический блок	до работы ≤ 500 после работы ≤ 1000
зал обслуживания	во время работы ≤ 1500
В операционных блоках больниц	≤ 500

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Культивирование микроорганизмов на питательных средах. Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Цель занятия: изучить способы посевов и пересевов микроорганизмов на питательные среды; изучить методы выделения чистых культур микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Атлас микроорганизмов, определитель Берджи, шкала цветов А. С. Бондарцева, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, чашки Петри стерильные, среда МПА стерильная, пипетки стерильные, шпатель Дригальского, культуры микроорганизмов, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов.

Задачи:

1. Ознакомиться с классификацией и методами стерилизации питательных сред.
2. Освоить различные техники посева микроорганизмов.
3. Ознакомиться с методами выделения чистых культур микроорганизмов.

Задание 1. Ознакомиться с классификацией и методами стерилизации питательных сред

Известно значительное количество питательных сред, используемых для культивирования и поддержания (сохранения) микроорганизмов.

мов. Питательной средой в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Для размножения любых бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и биохимические питательные компоненты.

Питательная среда должна удовлетворять следующим требованиям:

1) содержать все необходимые для роста и размножения микроорганизмов вещества;

2) иметь достаточную влажность (не менее 60% влаги);

3) иметь определенную концентрацию ионов водорода (рН);

4) быть изотонической для бактериальной клетки;

5) быть стерильной;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом;

7) быть унифицированной в отношении отдельных компонентов (аминный азот 2,5–3,0 г/л), хлоридов (на хлорид натрия – 0,5–0,8 %).

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Например, бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Гетеротрофные бактерии получают энергию в результате окисления (диссимилиации) восстановленных углеродных соединений. Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO_2 , органических кислот и др; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *E.coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли.

Молочнокислые бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), клетки которых не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**. Орга-

низмы, которые нуждаются в их добавлении к ростовой среде, называются **ауксотрофными** по соответствующим соединениям. Другая группа организмов, способная к росту на простых средах, содержащих источник углерода и энергии, а также набор основных биогенных элементов, получила название **прототрофных**. Следует учитывать и то, что в природе встречаются бактерии, которые способны размножаться в местах с низким пищевым потоком углерода – до 0,1 мг/л в день. Они получили название **олиготрофных**, противоположную группу для них составляют бактерии **копиотрофные** – способные к росту на богатых пищевых субстратах.

Среды классифицируют: по происхождению (исходным компонентам), консистенции, назначению (табл. 1).

Таблица 1

Классификация питательных сред

По составу	Естественные	Искусственные	Синтетические	
	Молоко, сы- воротка кро- ви, картофель	Среда Эндо, Гисса, МПА	Среда Козера (для цитратассими- лирующих бактерий), Ван- Интерсона (для дрожжей и плесне- вых грибов)	
По консистенции	Жидкие	Полужидкие	Плотные	Сыпучие
	для накопле- ния биомассы	для хранения культур (0,15– 0,5 % агара)	для выделения, изучения мор- фологии, ко- личественного учета (2 % агара)	для хранения посевого ма- териала в мик- робиологиче- ских производ- ствах (пшено, кварцевый пе- сок, пропитан- ный питатель- ным раствором)

По назначению	Обычные (простые)	Специальные	Элективные	Селективные	Накопительные	Дифференциально-диагностические
	МПА, МПБ, пептонная вода, бульон Хоттингера	для выделения и культивирования отдельных групп микроорганизмов (среда Сабу-ро – для возбудителей кандидомикозов, среда Чапека – для грибов, МПБ с глюкозой – для стрептококков)	для выделения определенного микро-организма из мест его естественного обитания	для выращивания определенного вида микро-организмов	для получения накопительных культур	для дифференцировки одного вида микроорганизмов от других

По назначению среды разделяют на **элективные** и **дифференциально-диагностические**. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, то есть при получении накопительной культуры. Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, определения видовой принадлежности, а также в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том,

что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды.

В состав **дифференциально-диагностической среды** входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить клоны, сбраживающие лактозу от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный (пептонный) агар, углевод и основной фуксин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развивается красная окраска соответствующих колоний.

По консистенции среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими. Жидкие питательные среды получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции. Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатина, силикагель, каррагенан. Наиболее распространенным из уплотнителей является агар – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из двух полисахаридов – агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45°С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) обычно используемые концентрации 1,5–2,0 % являются относительно невысокими и их использование эконо-

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

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

Задание 2. Освоить различные техники посева микроорганизмов

Материалом для посева могут быть пересеваемые культуры бактерий, вода, почва, продукты питания и др. Жидкий материал для посева берут петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку – «зеркало». Пипетками пользуются в том случае, когда материал засевают в большом или точно отмеряемом объеме. Способ взятия плотного материала определяется его консистенцией. При посевах чаще всего пользуются бактериальной петлей. Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производят над пламенем горелки. После посева на чашках Петри со стороны дна, на пробирках в верхней трети надписывают название засеянного материала и дату посева.

Техника посевов на плотные и жидкие питательные среды:

1. При посеве в жидкую питательную среду петлю с находящимся на ней материалом погружают в среду. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой. Жидкий материал, набираемый в пастеровскую или градуированную пипетку, вливают в питательную среду.

2. При посеве на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри чашку держат в левой руке. Дно ее, с одной стороны, придерживают I и II пальцами, а с другой – IV и V пальцами. Крышку, открытую настолько, чтобы образовавшаяся щель свободно проходила петля или шпатель, фиксируют I и III или I и II пальцами. Небольшое количество исследуемого материала втирают бактериальной петлей в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериальную петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхности, и проводят штрихи по всей сре-

де или по секторам, разграфив предварительно дно чашки (при условии, что среда прозрачна) на несколько равных частей. При этом надо стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева. Для равномерного распределения засеваемого материала по поверхности плотной питательной среды можно пользоваться вместо петли шпателем (рис 17).

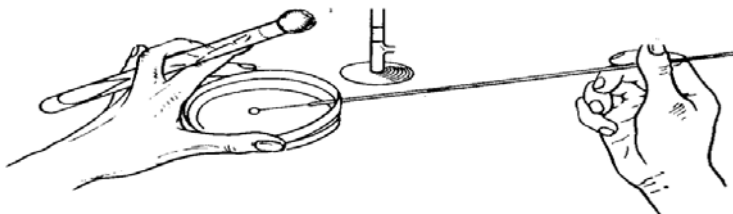


Рис. 17. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри

При обилии в засеваемом материале микроорганизмов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида. Из материала, подлежащего посеву в толщу плотной питательной среды, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1–1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Вслед за этим чашку заливают 15–20 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40–45 °С. Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку с содержимым слегка вращают по поверхности стола.

3. При посеве на скошенный мясопептонный агар («косяк») пробирку берут в левую руку между I и II пальцами, чтобы основание пробирки находилось на поверхности кисти руки и посев осуществлялся под контролем глаза. Пробку из пробирки вынимают правой рукой V и IV пальцами, не прикасаясь к той части пробки, которая входит внутрь пробирки. Остальные 3 пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериальной петли, посредством которой производится посев. Петлю держат, как писчее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном по-

ложении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха. Петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрих снизу вверх, от одной стенки пробирки к другой.

Задание 3. Ознакомиться с методами выделения чистых культур микроорганизмов

Чистой культурой микроорганизмов называют популяцию микроорганизмов одного вида, полученную из изолированной микробной колонии. Под колонией подразумевается потомство бактерий, возникающее в результате размножения одной микробной клетки. Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма. Для выделения чистых культур микроорганизмов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов (табл. 2–3).

Таблица 2

Методы выделения чистых культур аэробных микроорганизмов

Основанные на принципе механического разделения микроорганизмов	Основанные на биологических свойствах микроорганизмов
Рассев шпателем по Дригальскому (на трех чашках Петри)	Метод Шукевича (для подвижных форм микроорганизмов в конденсационную воду)
Рассев петлей (штрихами) в 3-х секторах	Метод прогревания (для бацилл)
Метод фильтрации (через специальные фильтры – для отделения вирусов от бактерий)	Бактериостатический метод (небольшие концентрации пенициллина задерживают рост грамположительных микроорганизмов и не влияют на грамотрицательные)
Рассев методом истощающего штриха	Метод заражения лабораторных животных или растений
Получение чистой культуры методом посева в глубине среды (по Коху)	Метод обогащения (засев на селективные среды, способствующие росту определенного вида микроорганизмов)

Методы выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов

Физические	Химические	Биологические
Посев в глубину плотных питательных сред	Поглощение кислорода пиригалоолом или гидросульфитом натрия для обеспечения преимущественного развития анаэробов	Совместное выращивание анаэробов со строгими аэробами
Механическое удаление воздуха из сосудов		
Замена воздуха инертным газом		
Посев в среды, содержащие легко окисляемые и редуцирующие вещества		

Чаще всего это делают путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, используя метод посева штрихом.

Посев штрихом. Существует много методов посева штрихом в чашки с твердыми средами («штрихованные чашки»), но лишь некоторые из них почти всегда дает хорошо изолированные колонии даже при отсутствии навыков у экспериментатора. Кроме того, можно наливать разведенные растворы смешанной культуры на поверхность твердых сред в чашках. При работе с анаэробами «штрихованные чашки» или чашки с внесенной в них жидкой культурой в атмосфере воздуха инкубируют затем в анаэроостате. Для анаэробов необходимы свежеприготовленные среды, и посев штрихом следует проводить в течение первых 4 ч после их автоклавирования, чтобы избежать накопления растворенного кислорода (рис. 18).

Получение чистой культуры методом посева в глубине среды (по Коху). Три пробирки, содержащие по 15 мл мясопептонного агара, ставят в водяную баню для расплавления агара. Расплавленную среду остужают до температуры 43–45 °С. В пробирку вносят одну бактериальную петлю исследуемого материала. Для лучшего перемешивания материала со средой засеянную пробирку вращают несколько раз, зажав между ладонями. После этого прокаленной и остуженной петлей содержимое 1-й пробирки переносят во 2-ю и таким же образом из 2-й в 3-ю. Приготовленные разведения микробов выливают из пробирок в стерильные чашки Петри, обозначенные номерами, соответствующими номерам пробирок. После застудневания среды с исследуемым материалом чашки помещают в термостат. Количество колоний в чашках с питательной средой уменьшается по мере разведения материала.

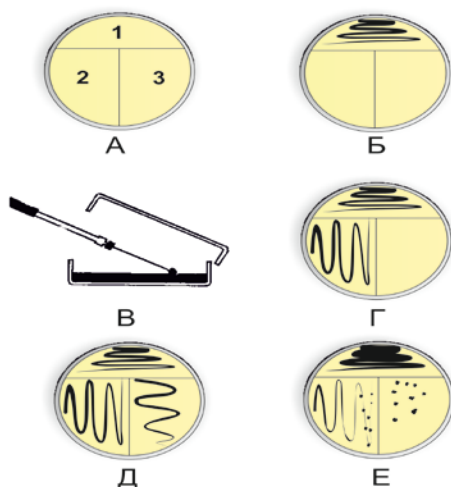


Рис. 18. Удобный метод посева штрихом в чашки для получения отдельных колоний: А – для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Т, разделяющую дно на 3 сектора; Б – Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности агара в секторе 1. Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают. Петлю стерилизуют в пламени и дают ей остыть (15 с); В – проводят петлей по поверхности среды в секторе 1; Г – затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 2. Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть; Д – проводят петлей по поверхности среды в секторе 3. Инкубируют опрокинутые вверх дном чашки, как показано на рисунке, для того чтобы конденсирующаяся вода с крышки не попала на поверхность агара; Е – в секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторах 2 и 3 появляются отдельные хорошо изолированные колонии

Выделение чистой культуры по способу Дригальского. Расплавленную питательную среду разливают в три чашки Петри. В первую чашку вносят одну каплю исследуемого материала и стерильным шпателем втирают его в поверхность питательной среды. Далее, не прожигая шпателя и не набирая нового материала, шпатель переносят во вторую и третью чашки, втирая в поверхность питательных сред оставшийся на нем материал. Метод посева по поверхности, предложенный Дригальским, является наиболее употребительным для получения чистой культуры микробов. Вместо шпателя можно пользоваться петлей.

Выделение чистой культуры методом истощающего штриха предполагает высев бактериологической петлей из накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рис. 19, *А*). Петлю стерилизуют, остужают и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рис. 19, *Б*). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении *В* (рис. 19), а после очередной стерилизации – в направлении *Г*. Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах *А* и *Б* вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах *В* и *Г* формируются изолированные колонии.

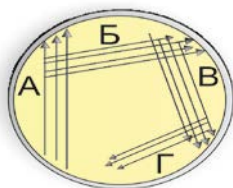


Рис. 19. Выделение чистой культуры микроорганизмов методом истощающего штриха

Вопросы к лабораторной работе № 6

1. Как классифицируются питательные среды?
2. Какие требования предъявляются к питательным средам?
3. Какие методы используют при выделении чистых культур аэробных и анаэробных микроорганизмов?

Учебная карта к лабораторной работе № 6

Ознакомиться с классификацией питательных сред. Изучить технику посева микроорганизмов на поверхность плотных сред и методы выделения чистых культур.

Работа выполняется в два этапа:

1. На основе полученных знаний выбрать схему получения чистых культур двух микроорганизмов из смешанного посева на поверхности чашки Петри. На первом этапе (1-е занятие) произвести получение чистых культур путем изолирования отдельных колоний.
2. На 2-м занятии подтвердить получение чистых культур на основании изучения культуральных и морфологических свойств и выде-

лить накопительную культуру из чистых культур путем посева штрихом на поверхность чашек Петри или в пробирки со скошенным МПА. Результаты занести в табл. 1.

Таблица 1

Морфологические и бактериальные свойства микроорганизмов

Бактериальная культура	1	2
Культуральные свойства		
Морфологические свойства		

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

Микрофлора воды

Цель занятия: изучить состав микрофлоры воды, ознакомиться с методами определения общего числа микроорганизмов и кишечной палочки в воде.

Материалы и оборудование. Атлас микроорганизмов, определитель Берджи, шкала цветов А. С. Бондарцева, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, чашки Петри стерильные, среда МПА стерильная, чашки Петри со средой Эндо, пипетки стерильные, шпатель Дригальского, пробирки стерильные, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов.

Задачи:

1. Ознакомиться с методами учета количественного и качественного состава микрофлоры воды.
2. Освоить методы определения общего микробного числа воды и выявления бактерий группы кишечных палочек.

Задание 1. Ознакомиться с методами учета количественного и качественного состава микрофлоры воды

Количественный и качественный состав микрофлоры воды зависит от вида источника и от степени его загрязнения. Вода открытых водоемов более богата сапрофитными микробами, чем подземные воды. Концентрация патогенных микроорганизмов в воде весьма незначительна и пребывание их в водоемах может быть кратковременным. Безопасность воды в эпидемическом отношении определяется косвен-

ными показателями: степенью общего бактериального загрязнения и содержанием бактерий группы кишечной палочки как показателя фекального загрязнения воды.

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП, также называются колиморфными и колиформными бактериями) – условно выделяемая по морфологическим и культуральным признакам группа бактерий семейства энтеробактерий, используемая санитарной микробиологией в качестве маркера фекальной контаминации, относится к группе так называемых санитарно-показательных микроорганизмов. К бактериям группы кишечных палочек относят представителей родов *Escherichia* (в том числе и *E. coli*), *Citrobacter* (типичный представитель *Citr. coli citrovorum*), *Enterobacter* (типичный представитель *Ent. aerogenes*), которые объединены в одно семейство *Enterobacteriaceae* благодаря общности морфологических и культуральных свойств.

Безопасность питьевой воды обусловлена не только фекальным загрязнением. Некоторые организмы размножаются в трубопроводных системах распределения воды (например, *Legionella*), другие встречаются в водоисточниках, однако многие из них могут вызывать вспышки заболеваний.

Безопасность питьевой воды в эпидемическом отношении определяется отсутствием в ней болезнетворных бактерий, вирусов и простейших микроорганизмов, ее соответствием нормативам по микробиологическим и паразитологическим показателям, представленным в табл. 2 Приложения к лабораторной работе № 7.

Задание 2. Освоить методы определения общего микробного числа воды и выявления бактерий группы кишечных палочек

Общая микробная обсемененность определяется количеством микроорганизмов, содержащихся в 1 мл воды. Исследуемую воду в зависимости от степени загрязнения разводят стерильной водопроводной водой 1:10, 1:100 и т. д. Затем по 1 мл из каждого разведения, начиная с большего, вносят в стерильные чашки Петри. В каждую чашку Петри выливают по 15 мл расплавленного и остуженного до 45 °С мясопептонного агара (МПА), равномерно распределяя содержимое по дну чашки. Остывшие чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат на 24 ч, после чего производят подсчет колоний. При малом количестве колоний счет ведут, пометив на дне чашки чернилами каждую сосчитанную колонию. Число выросших колоний соответствует количеству микроорганизмов в засеянном объеме воды.

Для получения среднего арифметического следует сосчитать число колоний, выросших в каждой чашке, затем умножить на соответствующее разведение. Результаты, посчитанные по отдельным чашкам, нужно сложить, а затем разделить на количество засеянных чашек. Полученное число будет являться показателем общей микробной обсемененности воды. Водопроводная вода должна иметь микробное число, не превышающее 100 в 1 мл.

Определение наличия кишечной палочки в воде. Индикатором свежего фекального загрязнения воды является кишечная палочка, которая обладает большой устойчивостью во внешней среде. Результаты обнаружения кишечной палочки в воде регистрируются в виде коли-титра или коли-индекса.

Коли-титр определяется тем количеством воды, в котором содержится одна кишечная палочка.

Коли-индекс – количество особей кишечной палочки, которое содержится в 1 л воды.

Методика исследования основана на применении дифференциально-диагностических сред, к которым относится среда Эндо. Фуксин обесцвечивается сульфитом натрия (образуется бесцветная фуксинсернистая кислота – реактив Шиффа). Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая дает цветную реакцию с фуксинсернистой кислотой с образованием свободного фуксина, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него. Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, имеют белый или слабо-розовый цвет.

Вопросы к лабораторной работе № 7

1. Какой видовой состав микрофлоры воды?
2. Какие микробиологические показатели качества воды вам известны?
3. Какие морфологические, культуральные и биохимические свойства бактерии *E. Coli* вы изучали?

Учебная карта к лабораторной работе № 7

1. Определить общее микробное число речной воды.

Взять пробу речной воды с соблюдением правил асептики. Приготовить разведения, чтобы при ее посева на МПА получить рост микроорганизмов в виде отдельных колоний. Для этого берут 2 про-

бирки, содержащие по 9 мл стерильной водопроводной воды. Стерильной градуированной пипеткой набирают 1 мл исследуемой воды и вносят в пробирку, тщательно перемешивая ее содержимое. Получается разведение 1:10. Для следующего разведения из пробирки № 1 переносят 1 мл жидкости в пробирку № 2 (разведение 1:100). Из разведений берут пипеткой по 1 мл воды, и соблюдая правила асептики, вносят каждое разведение в отдельную чашку Петри, затем вливают в чашки расплавленный и остывший до 45 °С МПА в количестве 15–20 мл. Чашки тотчас же начинают вращать по горизонтальной поверхности стола, равномерно распределяя МПА. После того, как агар застынет, чашки подписывают и оставляют до следующего занятия.

2. Определить присутствие кишечной палочки в пробах речной воды, воспользовавшись средой Эндо. Для этого из разведений 1:10 и 1:100 внести на чашки со средой Эндо по 1 мл воды. Стерильным шпателем Дригальского равномерно распределить жидкость по поверхности среды. Параллельно на чашку со средой Эндо нанести 1 мл водопроводной воды. Чашки подписать и оставить до следующего занятия.

3. Произвести расчет общего микробного числа воды.

4. Изучить культуральные и морфологические (форма бактерий, окраска по Граму) свойства микроорганизмов, выросших на чашках со средой Эндо. Наличие неспорных грамтрицательных палочек, имеющих колонии красного цвета на среде Эндо, подтверждает их принадлежность к группе колиморфных бактерий. Результаты занести в табл. 1.

Таблица 1
Культуральные и морфологические свойства микроорганизмов

Показатели	Речная вода		Водопроводная вода
	Разведение 1:10	Разведение 1:100	
ОМЧ			
Количество колоний красного цвета на среде Эндо			
Форма клеток			
Окраска по Граму			
Коли-титр			
Коли-индекс			

Сделать обобщающий вывод по результатам исследования.

Приложение к лабораторной работе № 7

Таблица 2

Патогенные микроорганизмы, переносимые водой, и их особенности в системах водоснабжения

Микроорганизм	Опасность с медикосанитарной точки зрения	Выживаемость в системах водоснабжения	Сравнительная инфекционность
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	низкая	может размножаться	низкая
<i>Campylobacter jejuni</i>	высокая	умеренная	умеренная
<i>Escherichia coli</i>	высокая	умеренная	высокая
<i>Legionella</i> spp.	высокая	размножается	умеренная
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	высокая	может размножаться	низкая
<i>Salmonella typhi</i>	высокая	умеренная	низкая
<i>Shigella</i> spp.	высокая	кратковременная	умеренная
<i>Vibrio cholerae</i>	высокая	кратковременная	низкая
<i>Yersinia enterocolitica</i>	высокая	длительная	низкая
Вирусы, в том числе аденовирусы, ротавирусы, вирусы гепатита А и Е	высокая	длительная	высокая

Таблица 3

Микробиологические показатели качества воды согласно СанПиН 0-124 РБ 99 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»

Наименование показателя	Единица измерения	Норматив
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствие
Общие колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствие
Общее микробное число	Число образующих колонии бактерий в 1 см ³	Не более 50

Наименование показателя	Единица измерения	Норматив
Колифаги	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий	Число спор в 20 см ³	Отсутствие

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Взаимоотношения между микроорганизмами

Цель занятия: изучить типы взаимоотношений между микроорганизмами.

Материалы и оборудование. Среда МПА, пипетки, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, шпатель Дригальского, стерильные чашки Петри, сверло.

Задачи:

1. Ознакомиться с типами взаимоотношений между микроорганизмами.
2. Освоить методы определения антагонистической активности.

Задание 1. Ознакомиться с типами взаимоотношений между микроорганизмами

В естественных условиях микроорганизмы существуют в сложных ассоциациях, внутри которых складываются разнообразные взаимоотношения, определяющиеся, в первую очередь, физиолого-биохимическими особенностями членов ассоциаций, а также различного рода экологическими факторами. Взаимоотношения между микроорганизмами могут быть разделены на симбиотические (симбиоз, метабиоз, сателлитизм, синергизм) и конкурентные (антагонизм, паразитизм, хищничество).

Симбиоз – взаимоотношения микроорганизмов, при которых два или более вида микроорганизмов при совместном развитии создают для себя взаимовыгодные условия. Типичный пример таких взаимоотношений – совместное развитие аэробных и анаэробных бактерий. В кефирных зернах одновременно развиваются молочнокислые бактерии и дрожжи, при этом молочнокислые бактерии, испытывающие потребность в витаминах, получают их в результате развития

дрожжей, последние получают благоприятные условия для развития за счет подкисления среды.

В некоторых случаях симбиотические взаимоотношения приводят к формированию так называемого консорциума, в котором клетки объединены как бы в один организм. Примером может служить консорциум *Pelochromatium roseum*. В центре консорциума находится относительная крупная подвижная бактерия *Desulfotomaculum*. На ее поверхности располагаются клетки зеленой серобактерии *Chlorobium*. В светлой зоне водоема в анаэробных условиях серобактерии обеспечивают поступление органического вещества и окисленной серы, а сульфатредуцирующая бактерия снабжает восстановителем.

Примером симбиоза являются взаимоотношения цианобактерий и микроскопических грибов в лишайнике. Оба партнера лишайника способны к самостоятельному существованию, но в условиях чрезвычайного дефицита питательных веществ и крайних пределов увлажнения и высыхания, их ассоциация в лишайнике дает взаимный выигрыш. Польза, получаемая грибом от симбиоза в таких условиях, очевидна: он зависит от цианобактерии, как от источника органических питательных веществ. Кроме того, цианобактерии способны фиксировать атмосферный азот, который также используется грибом. Вклад гриба в ассоциацию состоит в том, что он облегчает поглощение воды и минеральных веществ, а также защищает фотосинтезирующего партнера от высыхания и избыточной интенсивности света.

При **метабиозе** продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляются другими микроорганизмами в качестве питательного материала. Это почти всегда происходит при последовательном употреблении какого-либо субстрата. При использовании белковых субстратов в метабиозе последовательно могут принимать участие аммонификаторы, нитрификаторы и денитрификаторы. Между ними складываются синтрофные связи, при которых субстрат используется одновременно несколькими видами микробов. В частности, некоторые инфекционные заболевания человека являются полимикробными, то есть вызываются синтрофными ассоциациями бактерий. Газовая гангрена, например, обусловлена действием нескольких возбудителей из рода *Clostridium* в ассоциации с различными аэробными бактериями, главным образом, стафилококками и стрептококками.

Разновидностью метабиоза является **сателлитизм**, для которого характерно, что одни микроорганизмы выделяют в среду ростовые

вещества (аминокислоты, витамины и др.), стимулирующие развитие другого микроорганизма.

При **синергизме** у членов микробной ассоциации взаимно повышается физиологическая активность за счет выделения продуктов, стимулирующих их развитие. Помимо благоприятных взаимоотношений между микроорганизмами наблюдаются и такие, при которых один вид микроорганизмов полностью или частично подавляет рост и развитие других видов, то есть между ними при их развитии наблюдается антагонизм. Причины, приводящие к антагонизму:

1. Антагонизм, складывающийся при совместном развитии разных видов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах. В этом случае преимущества будут у того микроорганизма, скорость роста которого выше скорости роста других. Так, при совместном высеве на питательный субстрат, необходимый одновременно для роста и зубактерий и актиномицетов, зубактерии будут развиваться быстрее.

2. Антагонизм, связанный с образованием микроорганизмами органических кислот, спиртов, сидерофоров или других продуктов обмена, которые изменяют условия среды, делая ее непригодной для развития других микроорганизмов. В процессе смены микрофлоры свежего молока в нем содержатся как молочнокислые, так и гнилостные бактерии. Сначала они развиваются одинаково, но в результате размножения молочнокислых бактерий накапливается молочная кислота и молоко значительно подкисляется. В этих условиях наблюдается подавление роста, а затем и полная гибель гнилостных бактерий.

3. Антагонизм, связанный с образованием и выделением в окружающую среду антибиотических веществ (антибиотиков, бактериоцинов и др.).

Процесс **хищничества** состоит в том, что некоторые микроорганизмы разрушают клетки других видов микроорганизмов и используют их в качестве питательного субстрата. К числу микроорганизмов-хищников относят, главным образом, миксоформы (миксобактерии, миксомицеты, миксоамебы).

Паразитизм характеризуется тем, что один вид микроорганизмов (паразит) поселяется в клетках другого (хозяина) и питается за его счет. Облигатные паразиты не могут развиваться в отсутствие хозяина. Бактерии – паразиты утратили способность синтезировать многие вещества; они получают их в готовом виде за счет своего хозяина.

Случаи паразитизма в мире микроорганизмов относительно редки. Так, бактерии *Metallogenium*, состоящие из тонких нитей, пропи-

танных окислами железа и марганца, часто паразитируют на клетках или колониях бактерий, водорослей, грибов. К паразитам могут быть отнесены грамотрицательные бактерии *Bdellovibrio*. Бделловибрионы проникают в периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий и используют в качестве пищи продукты их метаболизма. К типичным паразитам относятся бактериофаги. Наиболее существенной формой конкурентных взаимоотношений, имеющей важное практическое использование, является образование микробами-продуцентами специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих развитие микроорганизмов других видов.

Задание 2. Освоить методы определения антагонистической активности

Для выделения микробов-антагонистов из естественных мест обитания применяют разнообразные методы. В основу большинства методов положен принцип выделения чистой культуры микроорганизма-продуцента антибактериального вещества и непосредственного его испытания по отношению к используемым тест-организмам. Микроорганизмы-продуценты выделяют из субстратов, где активно развиваются бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Например, на поверхность питательной среды, предварительно засеянной тест-организмом, петлей наносят взвесь почвы. Через 48–72 ч инкубирования формируются колонии. Вокруг некоторых из них наблюдаются зоны задержки роста тест-организма. Такие колонии отбирают и исследуют далее.

При определении же антагонистической активности данного штамма основной принцип заключается в создании условий для совместного культивирования антагонистов на агаризованных или в жидких питательных средах. Существует множество методических приемов, обеспечивающих решение данной задачи.

При использовании **метода перпендикулярных штрихов** на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делают по диаметру чашки, которую затем помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста. Продолжительность культивирования определяется скоростью роста антагониста. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевают штрихами тест-культуры, начиная от краев чашки. Чашки помещают в термостат на 48 ч. Если изучаемый микроорганизм-

антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха (рис. 20).

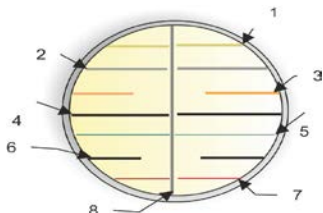


Рис. 20. Определение антагонистической активности микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов:

1, 2, 4, 5, 7 – рост нечувствительных, 3, 6 – рост чувствительных к антибактериальному веществу микроорганизма-антагониста (8) тест-культур

Метод агаровых блоков удобен тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах. Изучаемый на антагонистическую активность микроорганизм засевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе его роста сформировался «сплошной газон». После того, как клетки микроорганизма хорошо вырастут, стерильным пробочным сверлом (или пробиркой) вырезают агаровые блоки, которые переносят на предварительно засеянную тест-культурой поверхность среды в другой чашке Петри. Тест-культура засеивается шпателью, а агаровые блоки накладывают ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к агаровой пластинке. На одной чашке Петри можно разместить 4–5 агаровых блоков с различными продуцентами антибиотических веществ. Чашки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-культуры. В случае чувствительности последних к антибактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста. Чем больше выделяется антибактериального вещества, чем оно активнее и лучше диффундирует в среде, тем больше диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антибиотическому веществу данного продуцента клетки растут на всей поверхности среды (рис. 21).

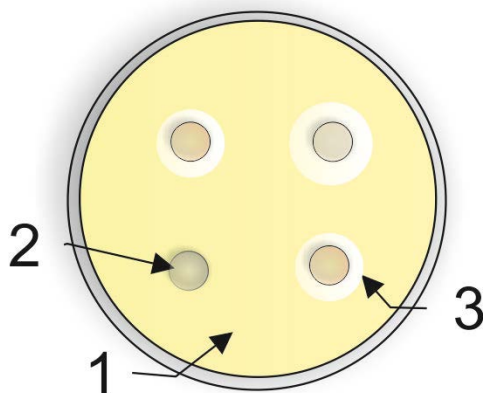


Рис. 21. Определение антагонистической активности методом агаровых блоков: 1 – тест-культура, 2 – агаровый блок, 3 – зона задержки роста тест-культуры

Метод отсроченного антагонизма применяется главным образом для исследования антагонистической активности бактерий, продуцирующих бактериоцины. Испытуемые клетки засевают макроколониями («пятнами») 0,3–0,5 см в диаметре на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри. На одной чашке можно проверить до 10 штаммов. Выросшие в результате инкубирования в течение 48 ч в оптимальных условиях бактерии стерилизуют в парах хлороформа (30 мин) и заливают тонким слоем агаризованной 0,7 % среды, в которую предварительно вносят 0,1 мл тест-культуры. Результаты учитывают через 24 ч инкубирования при температуре, оптимальной для роста индикаторных бактерий. Степень антагонистической активности характеризуется размером зон задержки роста тест-культуры вокруг макроколонии антагониста.

Изучение антагонистических взаимоотношений при совместном культивировании в жидкой питательной среде основано на подсчете числа жизнеспособных особей после совместного культивирования двух штаммов микроорганизмов, клетки которых при этом должны различаться друг от друга легко определяемыми признаками (пигментация, сбраживание углеводов, устойчивость к антибиотикам, ауксотрофность и др.). Кроме того, необходимо, чтобы оба микроорганизма одинаково хорошо росли при используемых условиях (температуре, составе среды и т. д.). Культуры изучаемых бактерий, находя-

щихся в стационарной стадии роста, разводят свежей питательной средой в 10 раз, смешивают в равных объемах и инкубируют в оптимальных для их развития условиях. Параллельно в тех же условиях инкубируют данные культуры независимо друг от друга. Через определенные промежутки времени отбирают пробы по 1 мл всех культур и после соответствующих разведений по 0,1 мл высевают на селективные для каждого штамма среды. Чашки помещают в термостат и после инкубирования подсчитывают количество сформировавшихся колоний. Определяют титр клеток и строят кривые роста бактерий при совместном и раздельном культивировании. По оси абсцисс откладывают время культивирования бактерий, по оси ординат – количество жизнеспособных клеток в 1 мл.

Вопросы к лабораторной работе № 8

1. Какие типы взаимоотношений между микроорганизмами вам известны?
2. Какие методы исследования антагонистической активности микроорганизмов вы использовали?

Учебная карта к лабораторной работе № 8

1. Исследовать антагонистическую активность микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов.

С внешней стороны разметить маркером чашку Петри. С соблюдением правил асептики произвести засев штрихом микроорганизма-антагониста на поверхность плотной питательной среды в чашку Петри.

Перпендикулярно к линии роста микроорганизма-антагониста микробиологической петлей произвести засев тест-культур. Результаты оценить на следующем занятии, заполнив табл. 1.

Таблица 1

Метод перпендикулярных штрихов

Микроорганизм-антагонист	Тест-культура
Результат исследования	
1.	
2.	

2. Исследовать антагонистическую активность микроорганизмов методом агаровых блоков.

С соблюдением правил асептики произвести засев шпателем Дригальского тест-культуры и исследуемых микроорганизмов чашки Петри. Оставить для формирования «сплошного газона» до следующего занятия.

Стерильным сверлом вырезать агаровые блоки из чашек с исследуемыми микроорганизмами и поместить их ростом вверх на поверхность чашек Петри со сплошным газоном тест-культуры. Результаты оценить на следующем занятии.

Сделать обобщающий вывод по результатам исследования.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

Микрофлора почвы

Цель занятия: изучить состав микрофлоры почвы; ознакомиться с методами определения общего числа микроорганизмов в почве.

Материалы и оборудование. Атлас микроорганизмов, определитель Берджи, шкала цветов А. С. Бондарцева, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, чашки Петри стерильные, среда МПА стерильная, чашки Петри со средой Эндо, пипетки стерильные, шпатель Дригальского, пробирки стерильные, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов.

Задачи:

1. Ознакомиться с микрофлорой почвы.
2. Ознакомиться с методами учета количественного и качественного состава почвы.
3. Изучить методы выявления микрофлоры ризосферы.

Задание 1. Ознакомиться с микрофлорой почвы

Отличительная особенность почвы как природного местообитания микроорганизмов связана с ее гетерогенностью, которая проявляется в разных пространственных масштабах. Почвенные микроорганизмы обитают в трехфазной полидисперсной среде, представленной твердой (минеральные и органические частицы), жидкой (почвенная вода) и газообразной (почвенный воздух) фазами.

Жизнедеятельность микроорганизмов в почве осуществляется в основном на почвенных частицах, в определенных микроразонах которых представлены клетки, ресурсы и микробные метаболиты. Поверхность почвенных частиц как жизненное пространство микроорганизмов может составлять несколько десятков квадратных метров в 1 г

почвы. Пространственная гетерогенность почв на макроуровне (пространственный масштаб примерно до 2 м) видна невооруженным глазом в почвенном разрезе. Выявляются почвенные горизонты, которые отличаются друг от друга по цвету, плотности, влажности и другим признакам. Чем ближе почва расположена к корневой системе растений, тем больше бактерий в ней содержится. Особенно много их на поверхности корня.

В почве, непосредственно прилегающей к корням, получившей название **ризосферы**, дополнительным источником питания бактерий служат в основном отмирающие клетки эпидермиса и корневые волоски. Питательными веществами для бактерий, развивающихся на корнях, являются продукты экзоосмоса растений (корневые выделения).

В ризосфере развиваются те же формы бактерии, что и в почве, отдаленной от корней. Как правило, на корнях преобладают неспороносные палочки рода *Pseudomonas* и микобактерии. При этом на корнях злаковых, бобовых и других растений часто поселяются разные виды и разновидности. Это объясняется неодинаковым обменом веществ у разных растений.

Бактерии в корневой зоне растений, используя корневые выделения, очищают зону корня от продуктов метаболизма растений. Минерализуя органические остатки, они переводят ряд элементов питания в доступную для растений форму. Отдельные виды бактерий, развивающиеся на корнях, продуцируя ростовые вещества и витамины, могут оказать положительное влияние на рост растений. Однако многие бактерии, развивающиеся в корневой зоне и на корнях, обладают денитрифицирующей способностью и в определенных условиях могут вызвать большие потери азота из почвы.

Микробиологический анализ почвы представляет собой комплексное исследование исходного материала с целью определить наличие, разновидности и численность бактерий. Анализ используется для оценки экологического состояния определенного участка земли, а также может проводиться в рамках токсикологических, профилактических и санитарно-гигиенических исследований.

Состав микрофлоры почвы меняется в зависимости от ее глубины. В поверхностном слое почвы (0–10 см) количество микроорганизмов незначительно. Это связано с губительным действием прямого солнечного света и низкой влажностью почвы. Максимальное количество микроорганизмов обнаруживается на глубине 10–30 см. На глубине 1 м выявляются единичные клетки бактерий. Наиболее богата микро-

организмами культурная возделываемая почва (до 5 млрд клеток на 1 г почвы), наименее – почва, бедная влагой и органическими веществами (200 млн клеток на 1 г).

Задание 2. Ознакомиться с методами учета количественного и качественного состава почвы

Отбор и подготовка почвенного образца для микробиологического анализа. Образцы почв для проведения микробиологических исследований отбирают в стерильные пакеты. Для получения статистически достоверных результатов с пробной площади отбирают от трех до десяти образцов методом случайных проб. Микробиологический анализ проводят непосредственно после отбора образцов или хранят образцы в морозильной камере при температуре – 5 °С.

Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу заключается в удалении крупных корней, разрушении почвенных агрегатов, десорбировании микроорганизмов с поверхности почвенных частиц, дезагрегировании микроколоний микроорганизмов. Для десорбции микроорганизмов и дезагрегирования микроколоний используется обработка почвенного образца ультразвуком на установке УЗДН-1 при следующем режиме: время обработки образца 4 мин, сила тока 0,44 А, частота 15 кГц. Для учета мицелиальных организмов в почве используют растирание почвенного образца, увлажненного до пастообразного состояния в течение 3–5 мин в фарфоровой ступке резиновым пестиком или пальцем в резиновом напалечнике. Возможно использование электрической пропеллерной мешалки (микроизмельчителя тканей) при следующем режиме: 2–3 тыс. об/мин, 5–10 мин.

Санитарно-микробиологическое состояние почвы оценивается на основании сопоставления количества термофильных бактерий и бактерий – показателей фекального загрязнения. Почвы с преобладанием санитарно-показательных бактерий расцениваются как санитарно-неблагополучные, загрязненные фекалиями человека или животных. Присутствие в почве *E. coli* и *Enterococcus faecalis* указывает на свежее (до 2 нед.), бактерий родов *Citrobacter* и *Enterobacter* – на несвежее (до 2 мес.), а *Clostridium perfringens* – на давнее (более 2 мес.) фекальное загрязнение. Более точная оценка проводится с помощью определения **коли-индекса** – количество бактерий группы кишечной палочки, обнаруженных в 1 г почвы, **перфрингенс-титра** – масса почвы (в граммах), в которой обнаружена 1 особь *Clostridium perfringens*, **общего числа** сапрофитных, термофильных и нитрифицирующих **бактерий** в 1 г почвы.

Для определения ОМЧ почву берут на глубине 10–15 см стерильным ножом (из разных мест не менее 10 проб) в стерильную банку. Из проб готовят навеску 30 г, которую вносят в колбу с водой (270 мл) и тщательно встряхивают. Готовят разведения 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Из 2-х последних разведений 0,1 мл смешивают с 40 мл 0,7 % расплавленного и остуженного до 45 °С МПА, после чего выливают двойным слоем в чашки с 2 %-ным агаром. Инкубируют в термостате. Подсчитывают количество выросших колоний.

Для определения коли-титра, перфрингенс-титра различные разведения почвенной суспензии засевают по 1 мл в пробирки со средой Кесслера. Инкубируют при 43 °С 48 ч. При получении в средах газообразования и помутнения производят высев петлей на среду Эндо. Отбирают типичные для кишечной палочки колонии, делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При выявлении в мазках грамотрицательных палочек ставят пробу на оксидазу. Если проба отрицательная, проверяют ферментативные свойства выделенной культуры посевом на полужидкую среду с глюкозой. Появление в среде кислоты и газа подтверждает наличие *E.coli*. Определяют коли-титр по наименьшему объему, в котором обнаруживают БГКП.

Для определения перфрингенс-титра различные разведения почвенной суспензии засевают в пробирки со стерильной железосульфитной средой Вильсон–Блера. После 48 часов инкубации при 43⁰С учитывают результаты по образованию черных колоний *S. perfringens* в агаровом столбике среды. Мазки окрашивают по Граму, микроскопируют (крупные грамположительные палочки со спорами овальной формы, центрального или субтерминального расположения), вычисляют перфрингенс-титр (наибольшее разведение посевного материала, посев которого приводит к почернению и разрыву среды в первые 12 ч роста при 43 °С).

Исследование почвенной микрофлоры методом обрастания стекол. На ровной поверхности почвы делают ножом разрез, глубина которого зависит от исследуемого горизонта. Отмытые и обезжиренные стекла (одновременно берут несколько стекол) плотно прижимают к вертикальной стенке разреза и засыпают почвой. Стекла выдерживают в почве от недели до нескольких месяцев.

После истечения времени экспозиции, убирают почву с тыльной стороны стекол, опытную поверхность стекол высушивают на воздухе и фиксируют трижды, проводя тыльной стороной над пламенем горелки. После фиксации стекло погружают в воду опытной поверхно-

стью вниз, не доводя его до дна. После промывки препарат погружают в раствор карболового эритрозина на срок от 30 мин до 24 ч. Окрашенные препараты исследуют под микроскопом с иммерсионной системой. При микроскопировании отмечают характер микрофлоры, плотность обрастания стекол и доминирующие формы.

Можно перед закладкой предметного стекла в почву покрывать его поверхность пленкой крахмало-аммиачного агара. В этом случае естественная микрофлора будет отражена на пластинке не совсем точно, и все же метод имеет определенные преимущества. На поверхности, покрытой агаровой пленкой, микроорганизмы развиваются быстрее. Состав микроорганизмов, растущих на агаре, определяется не только химическими компонентами среды, но и температурой, влажностью, аэрацией почвы, а также характером взаимосвязей между отдельными группами организмов.

Для приготовления таких предметных стекол в жидкую питательную среду, содержащую 2 %-ного крахмала и 0,1 %-ного аммиака, добавляют предварительно промытого 2 %-ного агара и полученный состав стерилизуют в автоклаве. С помощью стерилизованного спиртовым факелом пинцета стерильное предметное стекло удерживают в наклонном положении, пипеткой наносят на него горячий агар, который, стекая, покрывает тонким слоем всю поверхность стекла; излишки агара стекают с пластинки. Предметное стекло, покрытое агаровой пленкой, укладывают в стерильную чашку Петри и высушивают в сушильном шкафу при 35–45 °С, после чего вышеизложенным способом помещают в почву. Длительность инкубации в почве от 4 до 40 суток. Некоторые исследователи прикрепляют к поверхности стекла стерильную фильтровальную бумагу. В течение 1–2 месяцев пребывания в почве бумага совершенно разрушается, и на окрашенных пластинках можно наблюдать целлюлозные волокна, заселенные колониями разлагающих целлюлозу микроорганизмов.

Задание 3. Изучить методы выявления микрофлоры ризосферы

Учет бактерий в ризосфере методом Красильникова. Стерильной лопатой подкапывают почву под растениями, стерильным пинцетом извлекают корни. Приставшую к корням почву стряхивают в стерильную чашку Петри, тщательно перемешивают и из нее берут навеску в 1 г (одновременно берут навеску почвы для определения влажности). Навеску помещают в 100 мл стерильной водопроводной воды и готовят ряд разведений.

Осуществляют поверхностный посев из полученных разведений с использованием лабораторного пипет-дозатора, нанося 0,05 мл суспензии на поверхность питательной среды МПА и шпателем досуха втирая ее в агар.

Выросшие на агаре колонии подсчитывают визуально и под лупой. При поверхностном посеве (чтобы установить число зародышей в 1 мл) количество колоний на чашке еще умножают на 20.

Для определения качественного состава бактерий колонии на чашке группируют по культуральным признакам. Из каждой группы готовят препарат и выявляют форму бактерий. Для установления видовой принадлежности из колонии делают пересев на скошенный агар и после очистки культуры изучают ее морфологические и физиологические признаки.

Учет ризосферной и корневой микрофлоры методом последовательных отмываний корней по Е. З. Теппер. Из выкопанных монолитов почвы с растениями стерильными пинцетом и ножницами отбирают 1 г молодых корней (примерно одного диаметра) с прилегающими к ним частицами почвы (одновременно берут навеску почвы для определения влажности).

Корни помещают в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и взбалтывают в течение 2 мин. Стерильным крючком (приготовленным из обычной проволочной иглы) корни извлекают из колбы и переносят последовательно во вторую, третью, четвертую, пятую, шестую и седьмую колбы, также содержащие по 100 мл стерильной водопроводной воды. В каждой колбе корни отмывают по 2 мин.

Для качественного анализа бактерий ризосферы и на корнях из каждой колбы отдельно стерильной пипеткой берут 0,05 мл отмывной воды, наносят на поверхность питательной среды МПА и отдельным шпателем, держа полуоткрытую чашку около пламени горелки, втирают досуха. Чашки помещают в термостат при температуре 28–30 °С. Спустя 3–5 суток чашки можно анализировать.

По мере отмывания корней численность бактерий не убывает, а в ряде случаев даже увеличивается. При этом в чашках с посевом из первых отмываний появляется много крупных колоний, состоящих из спорозоных форм микроорганизмов. Однако по мере отмывания количество колоний бациллярных форм уменьшается и возрастает число мелкоточечных колоний, представляющих неспорозоные формы рода *Pseudomonas* и микобактерий. Колонии микобактерий часто окрашены в желтый или оранжевый цвета.

Для определения количества микроорганизмов в ризосфере и на корнях суспензию из первого отмывания дополнительно взбалтывают 5 мин, затем из нее готовят разведения, из которых делают поверхностные посевы. Содержимое остальных шести колб сливают вместе и также готовят последовательные разведения. Из них проводят поверхностные посевы на МПА.

Для подсчета зародышей в 1 г абсолютно сухой почвы ризосферы число колоний на чашке умножают на 20 (чтобы определить число зародышей в 1 мл) и на степень разведения, а затем делят на массу абсолютно сухой почвы ризосферы. Количество ризосферной почвы, попавшей с корнями в первую колбу, находят по разности первоначальной навески и навески отмытых корней (для чего из последней порции отмывной воды корни извлекают, помещают на фильтровальную бумагу для удаления воды и взвешивают).

При определении количества микроорганизмов на 1 г корней число колоний, выросших на чашке, умножают на 20, на степень разведения и на 600 (6 смывов по 100 мл в каждой) и делят на массу сырых корней.

В зависимости от задач, поставленных исследователем, можно использовать различный набор сред для культивирования микроорганизмов, развивающихся в корневой зоне растений. В лабораторной практике часто применяют следующие среды:

1. МПА с глюкозой (5–10 г глюкозы на 1 л МПА).
2. Синтетическая среда Чапека для актиномицетов.
3. Крахмало-аммиачный агар.

Студентам микрофлору ризосферы и корней рекомендуется изучать методом последовательных отмываний при посеве на МПА.

Методы выявления клубеньковых азотфиксирующих бактерий. От тщательно промытого в водопроводной воде корня бобового растения отрезают наиболее крупные клубеньки, промывают их в трех-четырёх порциях стерильной воды и опускают в чашку Петри с 0,1 %-ным раствором сулемы. Покачивая чашку, выдерживают 5 мин, затем переносят клубеньки стерильным пинцетом в чашку Петри со стерильной водой, выдерживая в ней 5 мин, затем переносят в чашку Петри со спиртом, где выдерживают 1 мин. Спирт удаляют обжиганием.

Далее стерильным пинцетом помещают клубеньки в стерильную чашку Петри и стерильным ножом разрезают на части. Из содержимого клубенька берут бактериологической петлей небольшое количество

взвеси, переносят в каплю стерильной воды на поверхность агаровой питательной среды в чашке Петри и размазывают шпателем. Этим же шпателем делают посев последовательно еще на двух пластинах.

Количественный учет клубеньковых бактерий в почве проводят с помощью титра, используя метод определения клеток бактерий. Наблюдая за образованием клубеньков при инокуляции растений почвой в разных разведениях, устанавливают численность клубеньковых бактерий в почве и их видовую принадлежность.

Для лучшего отделения клубеньковых бактерий от сапрофитной сопутствующей микрофлоры почвы рекомендуется добавлять в питательную среду для ризобий кристаллический фиолетовый в концентрации – 1:50 000–1:100 000 краситель (предварительно растворяют отдельно в этаноле), подавляющий развитие многих почвенных микроорганизмов и не влияющий на построизобий.

Вопросы к лабораторной работе № 9

1. Какой видовой состав микрофлоры почвы вам известен?
2. Какие существуют микробиологические показатели качества почвы?
3. Какие морфологические, культуральные и биохимические свойства клубеньковых азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium* вы знаете?

Учебная карта к лабораторной работе № 9

1. Приготовить почвенную суспензию. Влажную или сухую почвы хорошо перемешивают, высыпают на часовое стекло, предварительно протертое спиртом, освобождают от посторонних включений и крупных корней. Используют навеску в 1 г после соответствующей обработки почвы растиранием или другим способом, затем переносят ее в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды. Для разведения почвенной суспензии 1 мл почвенной суспензии из колбы (разведение 1:100) последовательно переносят в ряд пробирок с 10 мл стерильной водопроводной воды.

Посев почвенной суспензии на плотные среды проводят из разведений 1:10; 1:100; 1:1000 и т. д., в зависимости от таксономической принадлежности учитываемых микроорганизмов, типа почвы, ее влажности и других факторов. Разведение подбирают таким образом, чтобы на чашке развивалось 5–200 колоний бактерий и актиномицетов и 30–50 колоний грибов. При слишком густом или разреженном посеве подсчет количества микроорганизмов будет неточным.

Из каждого образца почв берут не менее 3–5 повторных навесок и каждую навеску высевают на 3–5 чашек со стерильной средой.

Для выделения и количественного учета бактерий почвенную суспензию высевают на одну из питательных сред (МПА, картофельно-аммиачный агар, почвенный агар, среду Эшби; для учета актиномицетов используют КАА или среду Чапека).

Техника посева. На поверхность застывшей подсушенной среды наносят пипеткой 1 каплю почвенной суспензии определенного разведения и с помощью стеклянного шпателя распределяют ее по всему агару. Засеянные чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Сроки учета микроорганизмов зависят от состава питательной среды и таксономического состава учитываемых организмов. На МПА учитывают на 2–3 сутки роста споровые и неспоровые формы бактерий. На среде Чапека и казеин-глицериновом агаре на 5–7 сутки роста учитывают колонии бактерий и актиномицетов, на сусло-агаре – на 5–7 сутки роста – колонии грибов и дрожжей.

2. Провести подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в 1 г почвы. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной колониеобразующей единицы (КОЕ), которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору или кусочек мицелия актиномицета или гриба. Поэтому, учитывая колонии микроорганизмов, выросшие на питательной среде, мы можем определить количество КОЕ в 1 г почвы. Подсчет количества колоний на чашке проводят со дна чашки в проходящем свете. На месте подсчитанной колонии чернилами по стеклу или фломастером ставят точку. В случае использования непрозрачных сред или учета колоний актиномицетов подсчет производят с поверхности агара.

Подсчитав количество колоний на всех параллельных чашках, вычисляют среднее их число на чашке, затем делают пересчет содержания колониеобразующих единиц в 1 г (КОЕ/г) почвы по формуле:

$$A = B \times V \times C,$$

где А – КОЕ/г почвы; В – среднее количество колоний на чашке; V – разведение почвенной суспензии, из которого произведен посев; С – количество капель в 1 мл суспензии (количество капель в пипетке на 1 мл, с помощью которой проводили посев).

Результаты анализов обрабатываются статистически с учетом ошибки среднего арифметического, среднего квадратического отклонения, коэффициента вариации или на компьютере с использованием программы STATISTICA.

Приложение к лабораторной работе № 9

Микробиологические нормативы для оценки санитарного состояния почвы:

✓ Чистая почва: коли-титр – 1 и выше; перфрингенс-титр – 0,01 и выше; ОМЧ – 100–1000;

✓ Загрязненная почва: коли-титр – 0,9–0,01; перфрингенс-титр – 0,009–0,0001; ОМЧ – 1000–100 000;

✓ Сильно загрязненная почва: коли-титр – 0,009 и ниже; перфрингенс-титр – 0,00009 и ниже; ОМЧ – 10 000–4 000 000.

СЛОВАРЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

Автоклав – аппарат для проведения различных процессов при нагревании и под давлением выше атмосферного. В микробиологической практике применяют автоклавы различной конструкции для стерилизации объектов высокотемпературным насыщенным водяным паром.

Автолиз – разрушение или саморастворение клеток за счет собственных (эндогенных) ферментов.

Автотрофы – микроорганизмы, синтезирующие все углеродсодержащие компоненты клетки из CO_2 , как единственного источника углерода.

Автохтонная микрофлора – специфические для данного биотопа виды.

Азотфиксация – усвоение молекулярного азота воздуха азотфиксирующими прокариотными организмами с образованием соединений азота, доступных для использования др. организмами.

Алкалофилы – микроорганизмы, развивающиеся в щелочных средах (рН 9,0–11,0). Облигатные А растут в пределах рН 8,5–11,0; факультативные – 5,0–11,0.

Аллохтонная микрофлора – микроорганизмы, наличие которых в определенной экосистеме обусловлено случайным повышением концентрации питательных веществ или появлением новых.

Антагонизм или конкуренция – взаимоотношения микроорганизмов в природных или лабораторных условиях, при которых один вид задерживает или подавляет полностью рост другого. Антагонистами могут быть представители всех групп микроорганизмов. При пассивном А угнетение конкурента достигается неспецифическими продуктами жизнедеятельности (кислотами, спиртами и т. д.), при активном А конкуренты выделяют в среду антибиотики или другие специфические соединения (см. бактериоцины). Деятельность микробов-антагонистов – один из факторов очищения почвы, воды от патогенных микроорганизмов.

Антигены бактериальные – вещества, входящие в состав бактериальной клетки или являющиеся продуктами ее обмена, обладающие свойствами антигенов. Различают несколько групп А. б. – О-антигены (соматические) – все антигены, заключенные внутри клетки, к ним относятся также токсичные термостабильные белки – эндотоксины; Н-антигены (жгутиковые) – белки жгутиков; К-антигены (капсульные) – полисахариды капсулы; а также внеклеточные антигены (см. антигены внеклеточные, серодиагностика).

Антисептика – комплекс мероприятий с использованием химических веществ (антисептиков), убивающих или подавляющих размножение микроорганизмов.

Антибиотики – высокоактивные, наследственно закрепленные метаболические продукты микроорганизмов, избирательно подавляющие рост различных бактерий.

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микробов на какой-либо объект.

Ацидофильные прокариоты – те микроорганизмы, для которых оптимальная среда обитания кислая (рН 4 и ниже).

Аэробы – микроорганизмы, получающие энергию используя кислород. Обязательные аэробы размножаются только в присутствии кислорода.

Анаэробы – организмы (в основном прокариоты), способные жить при отсутствии в среде свободного кислорода. Обязательные А получают энергию в результате брожения (маслянокислые бактерии и др.), анаэробного дыхания (метаногены, сульфатвосстанавливающие бактерии и др.) и аноксигенного фотосинтеза (фототрофные бактерии). Они не выносят присутствия молекулярного кислорода в среде. Факультативные А способны переключаться с одного способа получения энергии на другой (дыхание – брожение) в зависимости от наличия O_2 в среде (энтеробактерии, дрожжи и др.). Аэротолерантные А обладают метаболизмом анаэробного типа (напр., брожение), но могут расти в присутствии воздуха (молочнокислые бактерии). Термин ввел Л. Пастер.

Ауксотрофы – микроорганизмы, утратившие способность синтезировать одно из веществ, необходимых для их роста (аминокислоту, витамин или др.). Без добавления в питательную среду этого вещества ауксотрофы не растут.

Бактериоцины – антибактериальные вещества, синтезируемые бактериями, способные вызывать гибель бактерий того же вида или близких видов. *Колицины* – бактериоцины кишечных бактерий.

Биотоп – территориально ограниченный участок биосферы с относительно однородными условиями жизни.

Бактериостаз – задержка роста и размножения бактерий, вызванная действием неблагоприятных химических или физических факторов; прекращение действия фактора приводит к возобновлению роста и деления, хотя при длительном его воздействии может начаться гибель клеток, то есть фактор проявляет *бактерицидность*.

Вид – эволюционно сложившаяся совокупность особей, имеющая единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими, молекулярно-биологическими признаками.

Волютин – включения в клетках бактерий, представляющие собой полифосфаты.

Галофильные – микроорганизмы, растущие в средах с высокой концентрацией солей.

Ингибировать (лат. *inhibeo* – сдерживаю, останавливаю) – сдерживать, подавлять, угнетать.

R-S-диссоциация – своеобразная форма изменчивости бактерий, расщепление бактериальных клеток, формирующие 2 типа колоний – R и S-формы; одновременно с изменением морфологии колоний меняются биохимические, антигенные, патогенные свойства бактерий, их устойчивость к физическим и химическим факторам внешней среды.

Дисбактериоз – нарушение состояния эубиоза, утрата нормальной функции микрофлоры организма под влиянием различных факторов.

Индуктировать – (лат. *inductio* – побуждение, наведение) – возбуждать, стимулировать.

Деконтаминация микробная – полное или частичное удаление микроорганизмов с объектов внешней среды и биотопов человека с помощью факторов прямого повреждающего действия.

Дезинфекция – совокупность химических и механических способов полного уничтожения вегетативных и споровых форм определенных групп условно-патогенных для человека организмов с целью разрыва путей передачи возбудителей инфекционных заболеваний от источников инфекции к восприимчивым людям

Идентификация (индикация) – диагностическое исследование, которое достигается путем определения морфологических, культуральных, биохимических и других признаков микроорганизмов.

Is-последовательности – фрагменты ДНК, в которых содержится информация, необходимая для перемещения в различные участки ДНК бактериальной клетки.

Индекс – количество санитарно-показательных бактерий, содержащихся в 1 л жидкости, 1 г плотных веществ, 1 см³ воздуха.

Инокуляция – введение живых организмов в среды, организмы растений и животных; в микробиологической практике чаще употребляют термин посев, в медицине – заражение.

Клон – культура микроорганизма (популяция клеток), полученная из одной (родительской) клетки с известным генотипом путем бесполого размножения.

Колония – видимое изолированное скопление особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения одной бактериальной клетки на плотной питательной среде (на поверхности или в глубине ее).

Культивирование – выращивание микроорганизмов в искусственных условиях.

Культура микроорганизмов – вся совокупность микроорганизмов одного вида, выросших на плотной или жидкой питательной среде.

Конъюгация – перенос генетического материала из клетки-донора в клетку реципиента при их скрещивании с помощью половых ворсинок.

Коменсализм (нахлебничество) – вид взаимоотношений, когда одна популяция питается остатками пищи хозяина, которые в его рационе не имеют значение.

Микробиоценоз – сообщество популяций микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе.

Мутуализм – наблюдается в тех случаях, когда симбионты выполняют разные дополняющие друг друга жизненные функции.

Микробное число – общее количество микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы исследуемого объекта (1 см³ воды, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).

L-формы – бактерии, полностью или частично утратившие клеточную стенку, но сохранившие способность к размножению.

Нейтрофилы – микроорганизмы, для которых оптимальной для роста является среда близкая к нейтральной (рН от 4 до 9).

Осмофильными – называют микроорганизмы, развивающиеся в средах с высокой концентрацией сахара.

Протопласты – бактерии, полностью лишённые клеточной стенки при действии на них некоторых антибиотиков, которые сохраняют слабую метаболическую активность только в гипертонической среде, но утрачивают способность к размножению.

Прототрофы – микроорганизмы, которые могут сами синтезировать необходимые для роста соединения.

Паразиты – гетеротрофы, питающиеся органическими веществами живых организмов.

Питательные среды – среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размноже-

ния бактерий или других микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Плазида – молекула ДНК, состоящая из нескольких тысяч пар нуклеотидов, несущая информацию о некоторых признаках бактерий, находится в автономном состоянии или во встроенном в ДНК бактериальной клетки состоянии. F-плазида контролирует синтез половых ворсинок. R-плазида определяет устойчивость бактерии-хозяев к разнообразным лекарственным препаратам. Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства бактерий и токсинообразование. Бактериоциногенные плазмиды контролируют синтез бактериями бактериоцинов.

Популяция – совокупность особей одного вида, обитающих в пределах определенного биотопа.

Паразитизм – такой вид межвидовых связей, при котором одна популяция (паразит), нанося вред другой популяции (хозяину), извлекает для себя пользу. Факультативные паразиты могут длительно вести сапрофитический образ существования и только в особых условиях при снижении резистентности организма вызывают заболевания, почему их называют условно-патогенными микроорганизмами (оппортунисты). облигатные или строгие паразиты в естественных условиях размножаются только в организме хозяина, вне организма они могут сохраняться лишь некоторое время, не размножаясь.

Патогенными – называют микроорганизмы, которые могут вызывать заболевание.

Психрофилы – холодолюбивые микроорганизмы, зона оптимального роста 10–15 °С.

Пастеризация – освобождение от вегетативных форм микроорганизмов путем однократного прогревания при 70 °С в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением.

Резистентность – невосприимчивость, устойчивость к действию определенных факторов.

Резидентная (постоянная) облигатная микрофлора – представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме.

Сферопласты – бактерии, частично лишённые клеточной стенки при действии на них некоторых антибиотиков, способные существовать только в гипертоническом растворе, не способные размножаться.

Сапрофиты – гетеротрофы, утилизирующие органические остатки отмерших организмов в окружающей среде.

Симбиоз – взаимоотношения микроорганизмов, при которых два или более вида микроорганизмов при совместном развитии создают для себя взаимовыгодные условия. Степень взаимозависимости симбионтов варьирует от слабой (сотрудничество) до полной (мутуализм).

Стерилизация – совокупность физических и химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся форм микроорганизмов.

Серовары – штаммы одного вида, различающиеся по антигенным характеристикам.

Термофилы – теплолюбивые микроорганизмы, зона оптимального роста равна 50–60 °С.

Тиндализация (дробная стерилизация) – стерилизация термолabileльных материалов 3–4 кратным прогреванием текучим паром при 100 °С по 1 ч с перерывами в сутки, в течение которых материал содержится в термостате при 37 °С (для прорастания спор).

Тинкториальные свойства микроорганизмов – свойство микроорганизмов, характеризующее их способность вступать в реакцию с красителями и окрашиваться определенным образом.

Типовой штамм – штамм, выбранный в качестве постоянного образца того, что подразумевается под данным видом.

Титр – минимальный объем, или масса, в которой обнаруживаются данные бактерии.

Транспозоны – нуклеотидные последовательности бактериальной клетки, несущие генетическую информацию, необходимую для транспозиции (перемещения с одного репликона на другой) или выполняющие регуляторные и кодирующие функции.

Трансформация – непосредственная передача генетического материала (фрагмента ДНК) донора реципиентной клетке.

Трансдукция – передача генетического материала от одних бактерий другим с помощью фагов.

Фаготипы – штаммы одного вида, различающиеся по чувствительности к специфическим фагам.

Фототрофы – микроорганизмы, способные использовать солнечную энергию.

Фитонциды – антибактериальные вещества, которые образуют растения.

Хемотрофы – микроорганизмы, получающие энергию за счет окислительно-восстановительных реакций.

Хищничество – вид взаимоотношений, когда одна популяция использует другую популяцию в качестве источника питания.

Чистая культура – микробные особи одного и того же вида, выращенные на питательной среде.

Штамм – культура микробов одного вида, выделенная из определенного источника (организм человека, животного, окружающая среда).

Эндоферменты – ферменты микроорганизмов, которые локализируются в их цитоплазме.

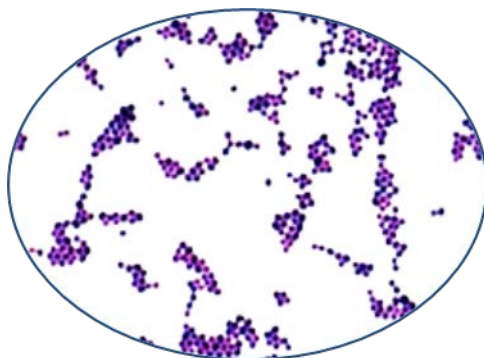
Экзоферменты – ферменты микроорганизмов, которые выделяются в окружающую среду.

Эубиоз – состояние динамического равновесия микрофлоры и организма человека.

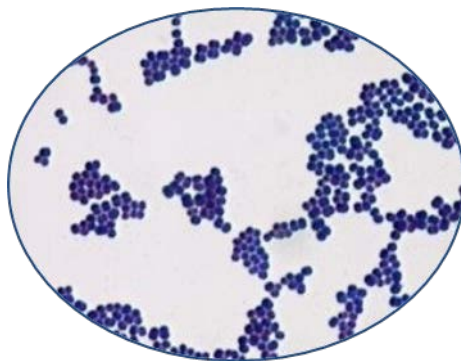
**ВИД БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ПРИ МИКРОСКОПИРОВАНИИ**
**Морфологические, культуральные, физиологические
и тинкториальные признаки основных родов
бактериальных культур**

Род Staphylococcus

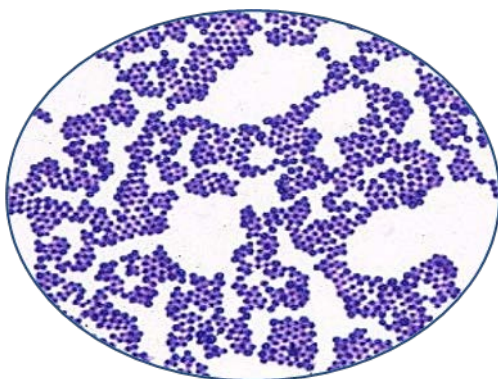
Грамположительные кокки, неподвижные, характерно деление в нескольких плоскостях, в результате микробные клетки в чистой культуре располагаются «виноградными гроздьями», диаметр клетки составляет от 0,6 до 1,2 мкм, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы с окислительным и ферментативным типом метаболизма, спор и капсул не образуют. Формы колоний на твердых средах округлые, выпуклые, пигментированные (белые, желтые, золотистые)



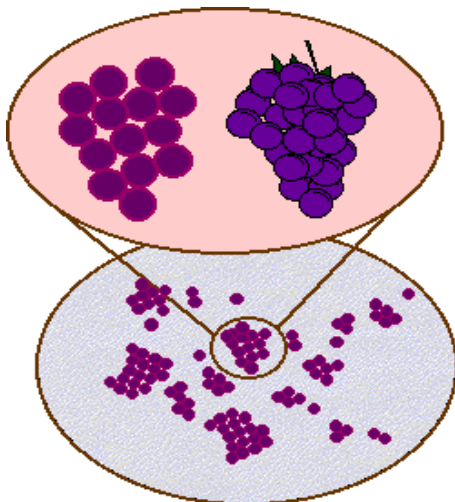
Staphylococcus saprophyticus



Staphylococcus aureus



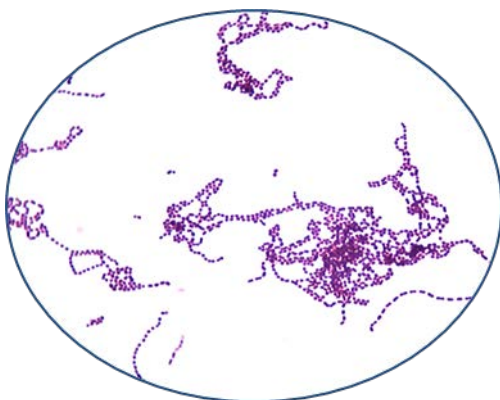
Staphylococcus epidermidis



Схематическое изображение стафилококков

Под Streptococcus

Грамположительные кокки, неподвижные, клетки шаровидные менее 1 мкм в диаметре, располагаются цепочками, хемоорганотрофы, факультативные анаэробы, спор не образуют. Образуют капсулу и L-формы. Растут на средах с добавлением крови, сыворотки крови, углеводов, температурный оптимум 37 °С, рН 7,2–7,4. Формы колоний на твердых средах мелкие плоские сероватые, на жидких средах дают крошковатый пристеночный и придонный рост, на кровяном агаре – зоны α - или β -гемолиза.



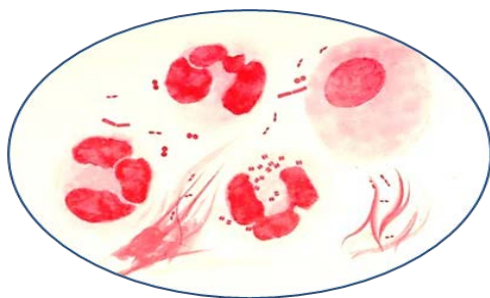
Streptococcus pyogenes



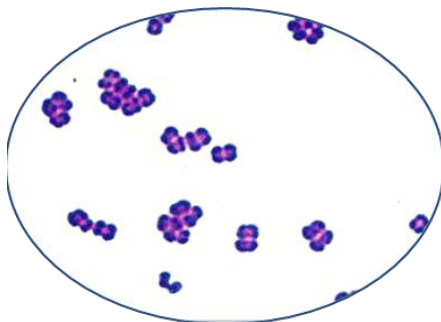
Streptococcus sp.

Pod Neisseria

Грамотрицательные диплококки (менингококк, гонококк), клетки округлые диаметром 0,6–1,0 мкм, располагаются попарно, по форме напоминают кофейные зерна, полиморфны, неподвижны. Отношение к окраске по Граму выражено нечетко, молодые клетки окрашиваются интенсивно, а отмирающие и мертвые клетки – слабо. Спор не образуют. Клинические изоляты образуют макрокапсулу, которая утрачивается при росте на питательных средах. Строгие аэробы, очень требовательны к питательным средам (сыворотка, кровь, яичный желток и др.) и условиям культивирования.



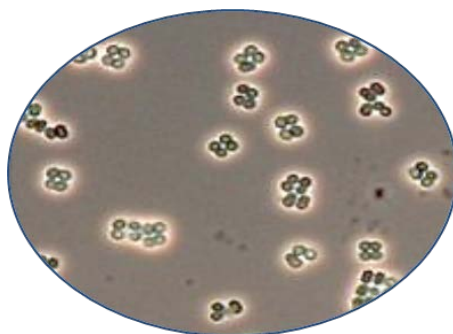
Neisseria gonorrhoeae



Neisseria meningitidis

Под Sarcina

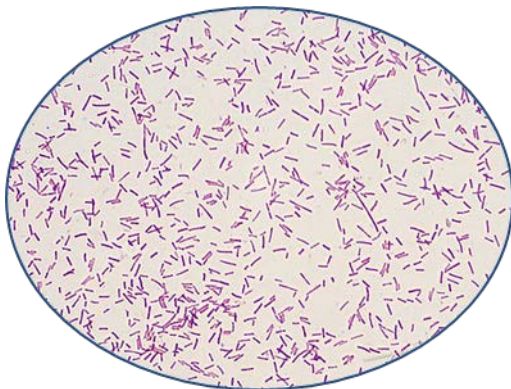
Грамположительные кокки, делящиеся в трех взаимно перпендикулярных направлениях, образуя при этом кубические «тюки», от чего и получили свое название. Сапрофиты, спор не образуют, неподвижны, непатогенны. Обитают в почве, воде, воздухе и в живых организмах (являются частью микрофлоры человека).



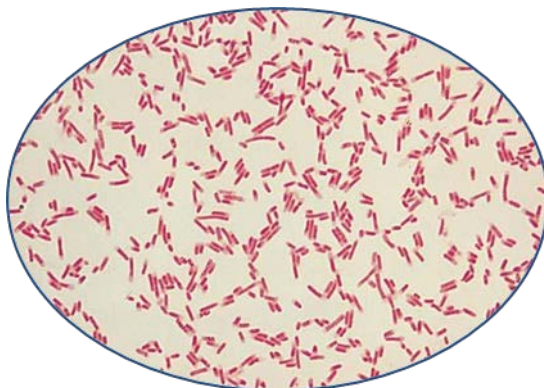
Sarcina aurantiaca

Под Escherichia

Грамотрицательные палочковидные бактерии со слегка закругленными концами, размером $0,4-0,8 \times 1-3$ мкм, факультативные анаэробы, не образует эндоспор, подвижны, перитрихии. Содержатся в количестве 10^6-10^8 КОЕ/г в толстом кишечнике взрослого человека. Являются индикатором при исследовании образцов на наличие фекальных загрязнений.



Escherichia coli

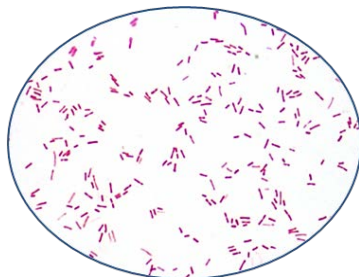


Escherichia coli

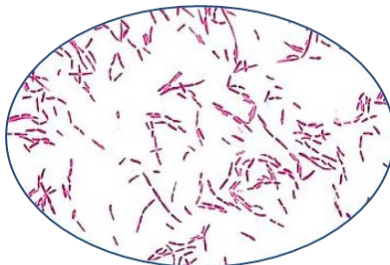
Под Pseudomonas

Грамотрицательные прямые или искривлённые с закругленными концами палочковидные бактерии размером $1-5 \times 0,5-1,0$ мкм, подвижные, монотрихи или лофотрихи, обитают в воде и почве, условно патогенные для человека, возбудители нозокомиальных инфекций. Хемоорганогетеротрофы, облигатные аэробы. Растут на простых питательных средах, при 42°C (оп-

тимум 37 °С). Продуцируют характерные пигменты: пиоцианин (окрашивает среду в сине-зеленый цвет), пиовердин (желто-зеленый флюоресцирующий пигмент) и пиорубин (бурого цвета).



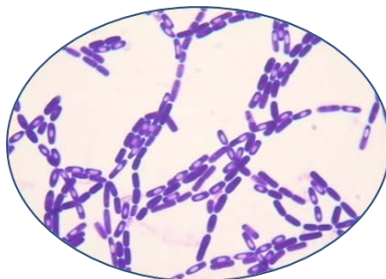
Pseudomonas aeruginosa



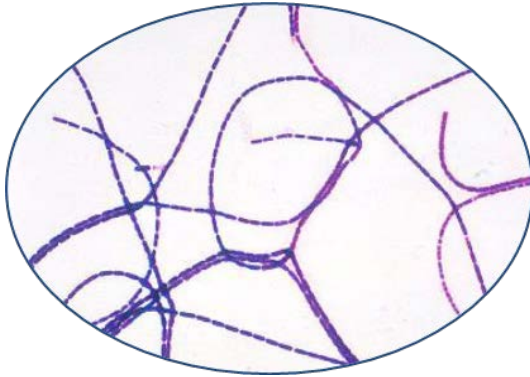
Pseudomonas fluorescens

Под *Bacillus*

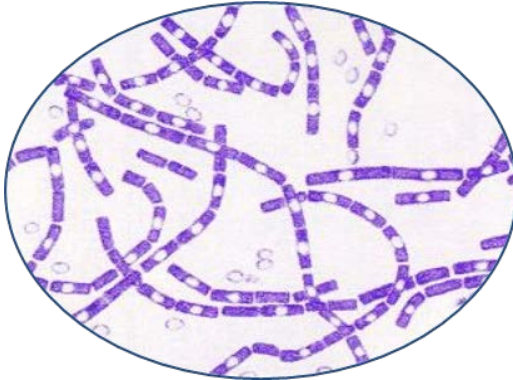
Грамположительные прямые или слабо изогнутые палочки, длина клеток 4–10 мкм, ширина 0,6–2,0 мкм, аэробы или факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы, растут на простых питательных средах, подвижны, с перитрихально расположенными жгутиками, образуют эндоспоры, *Bacillus anthracis* образует капсулы.



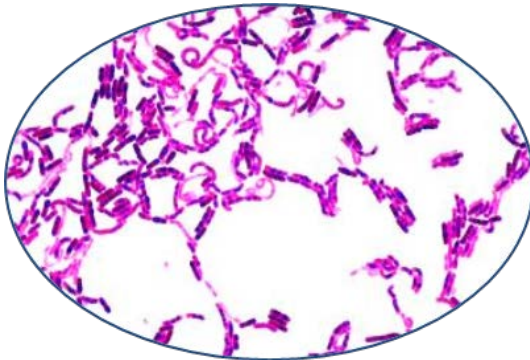
Bacillus cereus



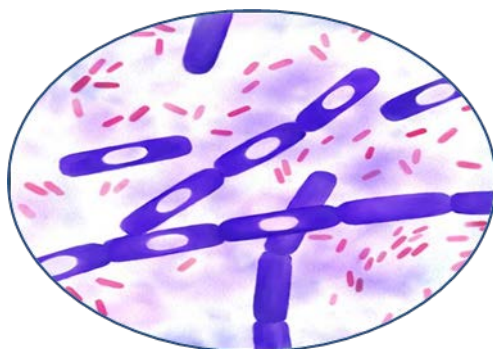
Bacillus cereus



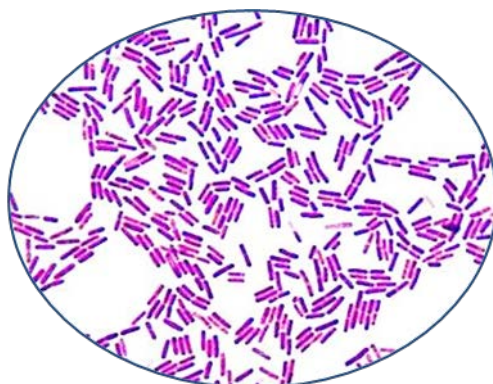
Bacillus anthracis



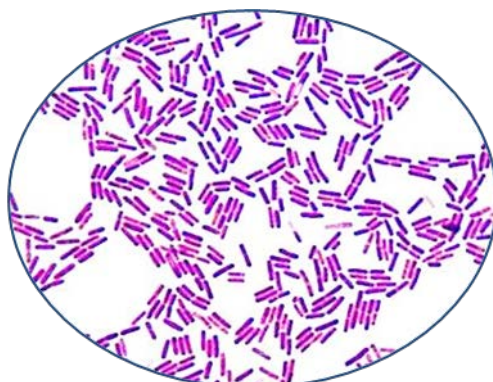
Bacillus mycoides



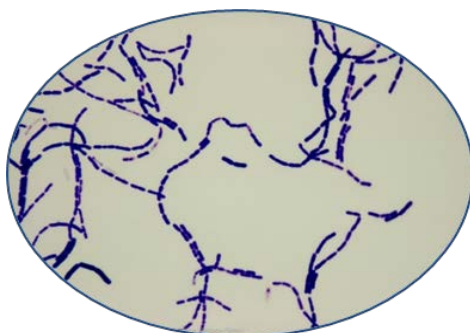
Bacillus cereus (грам+) и *Serratia marcescens* (грам-)



Bacillus subtilis



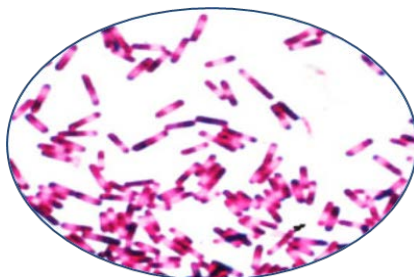
Bacillus subtilis



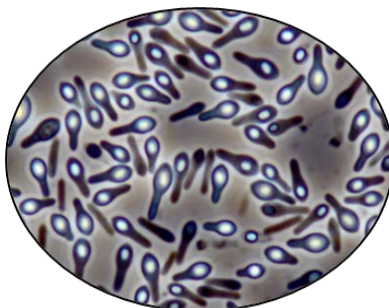
Bacillus megaterium

Pod Clostridium

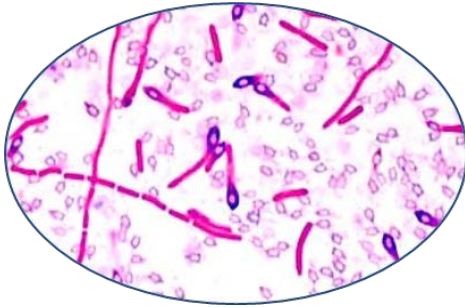
Грамположительные, удлинённые палочки, облигатные анаэробы, образуют эндоспores, которые могут располагаться центрально, терминально, субтерминально. Форма бактериальных клеток веретенообразная, «раздувается» из-за споры, диаметр которой всегда больше, чем диаметр самой клетки. Прodуцируют яды – ботулотоксин (*C. botulinum*) и тетаноспазмин (*C. tetani*).



Clostridium perfringens



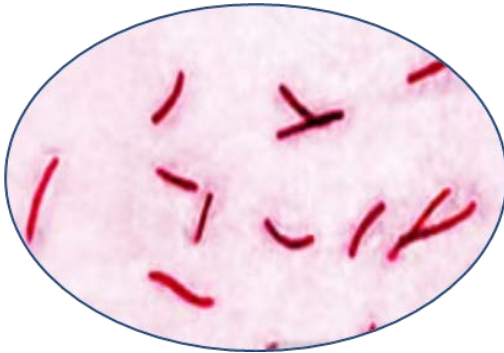
Clostridium botulinum



Clostridium tetani

Под *Mycobacterium*

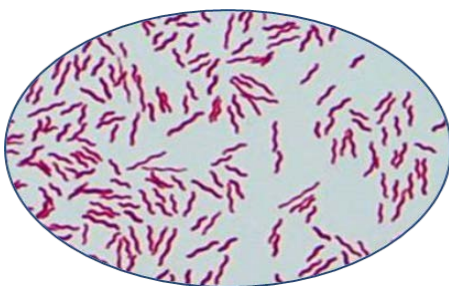
Окрашиваются слабо, грамположительно, тонкие прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1–4 мкм и шириной 0,3–0,6 мкм, аэробы, неподвижны, спор и капсул не образуют, полиморфны. Кислото- и спиртоустойчивы. В связи с высоким содержанием миколовых кислот плохо окрашиваются обычными методами, но хорошо – по Цилю–Нильсену. Характеризуются медленным ростом на питательных средах.



Mycobacterium tuberculosis

Под *Campylobacter*

Грамотрицательные тонкие спиралевидные (1–2 завитка) палочки, размерами 0,5–5,0 × 0,2–0,8 мкм. Характерные винтообразные движения создают единичные жгутики, расположенные на одном или обоих концах клетки. Микроаэрофилы. Спор и капсул не образуют.



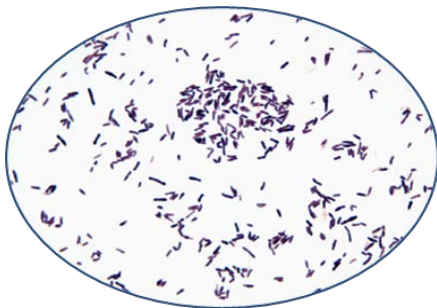
Campylobacter sp.

Под Corynebacterium

Грамположительные крупные $1-8 \times 0,3-0,8$ мкм прямые или слегка изогнутые полиморфные палочки, на полюсах клеток локализуются зерна волютина, придавая клеткам характерную форму «булавы», окрашиваются метиленовым синим либо по Нейссеру. Располагаются одиночно или в форме латинской буквы V или Y. Спор не образуют, иногда формируют микрокапсулы. Хемоорганогетеротрофы, факультативные анаэробы.



Corynebacterium diphtheriae



Под Vibrio

Грамотрицательные вибрионы имеют форму палочки размером $1,5-4 \times 0,2-0,4$ мкм, изогнутой в виде запятой. Подвижны, имеют монотрихально расположенный жгутик, спор и капсул не образуют, хемоорганогетеротрофы, аэробы, факультативные анаэробы. Растут на простых питательных средах, на плотных средах образуют круглые, прозрачные, голубоватые колонии, обладающие слабой опалесценцией, на жидких – легкое помутнение и пленку.



Vibrio cholerae

Под Spirillum

Грамотрицательные спирально извитые или дугообразно изогнутые палочки (спириллы), шириной от $0,6-0,8$ до $2-3$ мкм, длина от $1-3,2$ до $30-50$ мкм, спор не образуют, подвижны, плохо растут на питательных средах, в природе – сапрофиты.



Под Spirillum sp.

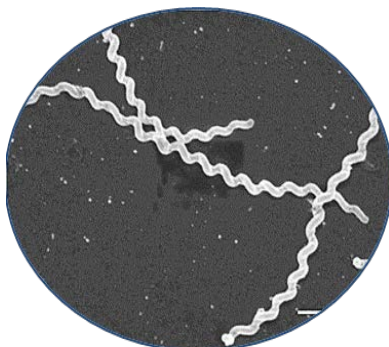
Порядок Spirochaetales

Грамотрицательные спирохеты – бактерии с длинными ($3-500$ мкм) и тонкими ($0,1-1,5$ мкм в диаметре) спирально закрученными (один и более

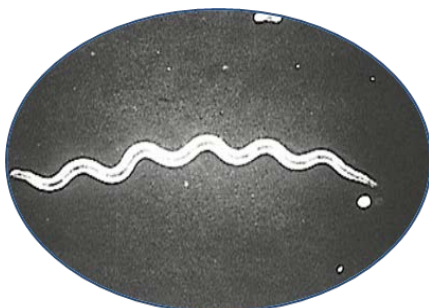
виток спирали) клетками. Хемоорганогетеротрофы. подвижны, движения винтообразны, сгибательны, эндоспор не образуют. Аэробы, анаэробы и факультативные анаэробы. Спирохеты встречаются в почве и воде.



Род Treponema



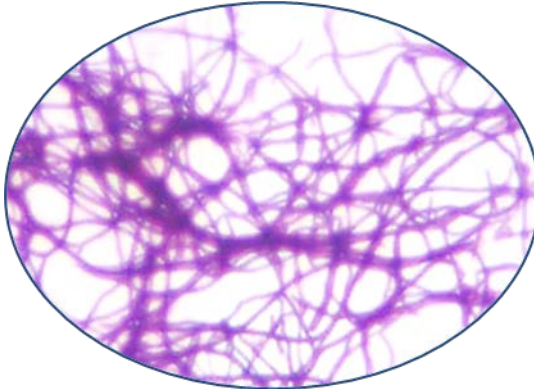
Род Leptospira



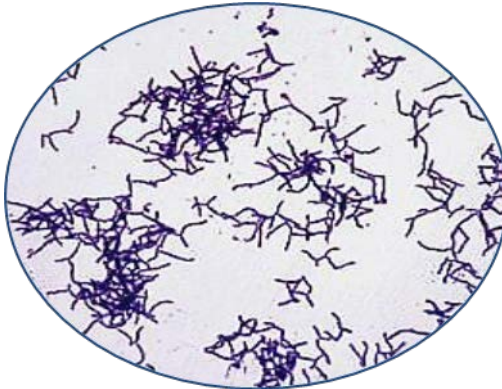
Род Borrelia

Под Streptomyces

Ветвящиеся бактерии, мицелий имеет вид тонких прямых палочек, образуют нити и хорошо развитый мицелий. Обладают признаками, общими с бактериями и с грибами. Как бактерии они содержат ядро типа нуклеоида, состоят из одной клетки, покрытой оболочкой, грамположительны. В то же время они имеют форму ветвящейся нити, которая характерна для грибов. Образуют споры, хемоорганотрофы, облигатные и факультативные анаэробы. Известны как продуценты антибиотиков. Благодаря выделению летучего соединения – геосмина, имеют характерный «землистый» запах.



Streptomyces sp.



Streptomyces sp.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воробьев, А. А.* Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для студентов медицинских вузов / А. А. Воробьев, А. С. Быков – М.: Медицинское информационное агентство, 2003.
2. *Громов, Б. В.* Строение бактерий / Б. В. Громов. – Л.: Ленингр. ун-т, 1985.
3. *Громов, Б. В.* Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л.: Ленингр. ун-т, 1989.
4. *Гусев, М. В.* Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М.: МГУ, 1992.
5. *Зеленова, Е. Г.* Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие / Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Е. В. Салина, С. П. Рассанов. – Нижний Новгород: НГМА, 2004.
6. *Зенова, Г. М.* Практикум по биологии почв: учебное пособие / Г. М. Зенова, А. Л. Степанов, А. А. Лихачева, Н. А. Манучарова. – М.: МГУ, 2002.
7. *Колешко, О. И.* Микробиология с основами вирусологии / О. И. Колешко, Т. В. Завезенова. – Иркутск: Иркут. ун-т, 1999.
8. *Лысак, В. В.* Микробиология: учебное пособие / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007.
9. *Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта и др.* – М.: Мир, 1997.
10. СанПиН 10-124 РБ 99 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».
11. *Теппер, Е. З.* Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М.: «Колос», 1979.
12. *Шлегель, Г.* Общая микробиология / Г. Шлегер. – М.: Мир, 1987.

Учебное издание

Бученков Игорь Эдуардович
Грицкевич Евгений Ростиславович
Иконникова Наталья Валерьевна [и др.]

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Пособие

Редактор *А. В. Красуцкая*
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*
Корректор *Л. М. Корневская*

Подписано в печать 01.06.2017. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 7,12. Уч.-изд. л. 4,53.
Тираж 30 экз. Заказ № 255.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.