

Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Владимирский государственный университет

О.В. ПРУНТОВА, О.Н. САХНО

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Владимир 2005

УДК 576.8
ББК 28.4
П85

Рецензенты:

Кандидат биологических наук,
зав. кафедрой ботаники Владимирского
государственного педагогического университета
В.Б. Кулиш

Доктор ветеринарных наук, зав. лабораторией
микробиологии Федерального Центра охраны
здоровья животных г. Владимир
В.С. Русалеев

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Владимирского государственного университета

Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиоло-
П85 гии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно ; Владим. гос. ун-т. – Владимир :
Изд-во ВлГУ, 2005. – 76 с. – ISBN 5-89368-586-5.

Содержит работы, которые позволяют студентам приобрести навыки работы с микроорганизмами, изучить их морфологию, культуральные, физиологические и биохимические свойства, освоить методы микробиологического исследования объектов окружающей среды.

Предназначено для студентов специальностей «Биология» (011600), «Экология» (013100), «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (320700).

Табл. 11. Библиогр. 13 назв.

УДК 576.8
ББК 28.4

ISBN 5-89368-586-5

© Владимирский государственный
университет, 2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

Основное внимание в предлагаемом издании уделено освоению студентами методов микроскопирования, посевов и пересевов (получению чистых культур) микроорганизмов, культивирования микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах, определения их количества в пробах из объектов окружающей среды, идентификации микроорганизмов по биохимическим свойствам.

Практикум содержит 29 лабораторных работ по основным разделам общей микробиологии и построен в соответствии с действующей программой по этому предмету.

Перед каждой работой помещен перечень оборудования и материалов, необходимых для ее проведения. После каждого раздела даны контрольные вопросы, а в конце работы – тесты для проверки усвоения материала.

В качестве объектов исследования при выполнении работ предлагается использовать культуры микроорганизмов, широко распространенных в окружающей среде, которые участвуют в биогеохимических превращениях веществ в природе и используются в биотехнологических процессах.

Практикум не повторяет работы в изданных ранее учебных пособиях по микробиологии, а содержит задания, позволяющие студентам приобрести навыки работы с микроорганизмами, изучить их морфологию, культуральные, физиологические и биохимические свойства, освоить методы микробиологического исследования объектов окружающей среды.

В руководстве представлены некоторые работы, выходящие за пределы программы, которые могут быть использованы в исследованиях по курсовым и дипломным работам студентов, а также при проведении занятий по курсам «Экология бактерий», «Организмы и среда», «Физиология растений».

I. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней

В учебных заведениях не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами. Необходимо помнить, что при посеве сапрофитных микроорганизмов из окружающей среды случайно может быть внесена и патогенная микрофлора. Кроме того, работа с сапрофитными бактериями в ряде случаев требует абсолютной стерильности для получения надежных результатов опыта. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют **чистой**. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название **смешанной**.

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Поверхность столов и пол всех лабораторных помещений покрывают легко моющимся материалом. В основном рабочем помещении находятся аппаратура, посуда и реактивы. Столы имеют подводку электроэнергии и снабжены газовыми горелками. Кроме основного рабочего помещения лаборатория имеет стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, бокс, моечную, холодильную комнату, термостаты или термостатированные комнаты для выращивания микроорганизмов, помещение для хранения культур и т.д.

Подготовка микробиологической лаборатории к работе

Для того чтобы снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях, в лабораторных помещениях применяют 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 просто 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. Ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способностью, поэтому в зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов. **Необходимо иметь в виду, что ультрафиолетовые лучи могут вызвать тяжелые поражения глаз.** Поэтому при работе с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. **В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя.**

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.**

Правила работы с культурами микроорганизмов

В лаборатории микроорганизмы выращивают в питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрацы 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, когда пересевают культуры микроорганизмов, выросшие в жидкой питательной среде, пользуются стерильной пипеткой. Исползованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 3 – 5%-ный водный раствор фенола или 2%-ный раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

Все манипуляции при посеве следует проводить около пламени горелки (но не в пламени). Нельзя делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения.

2. Методы стерилизации питательных сред и посуды

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание. В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Различают *термическую* и *холодную* стерилизацию. *Способы термической стерилизации*: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. *Методы холодной стерилизации*: стерилизация фильтрованием, газообразными средствами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяется в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

Стерилизация питательных сред насыщенным паром под давлением (автоклавирование)

Совместное действие высокой температуры и давления пара обеспечивает особую эффективность данного способа (табл. 1).

Таблица 1

Температура насыщенного пара при разных давлениях

| Давление | | Температура, °С |
|-----------------|--------|--------------------|
| нормальное, атм | кПа | |
| 1,0 | 101,32 | 100 |
| 1,5 | 151,98 | 111 |
| 2,0 | 202,65 | 121 |
| 2,5 | 251,20 | 128 |
| 3,0 | 299,75 | 134 |

При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдержи-

вают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121 °С. Стерилизацию текучим паром под давлением осуществляют в автоклавах. Автоклав представляет собой металлический двустенный резервуар, способный выдерживать высокое давление, в который помещают стерилизуемый материал на специальную подставку. Предметы следует размещать не слишком плотно, так как пар должен проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. По окончании времени стерилизации автоклав открывают, когда давление в нем сравняется с атмосферным. **Преждевременное открывание крана автоклава недопустимо**, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала.

К работе с автоклавом допускаются только подготовленные лица!

Подготовка сред к стерилизации. При автоклавировании 3 – 5 % жидкости теряются в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию. Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками с бумажными колпачками. Стеклянные, резиновые, корковые и другие пробки завертывают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой.

Выбор режима автоклавирования. В микробиологической практике стерилизацию в автоклавах осуществляют при температуре в пределах 111 – 138 °С, т.е. от 0,5 до 2,5 атм. Температура ниже 111 °С не может считаться надежной; а выше 138 °С, как правило, не является необходимой, к тому же, чем выше давление пара, тем сложнее условия эксплуатации автоклава. Микробиологи чаще всего стерилизуют среды при 0,5 и 1 атм.

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются, прежде всего, их составом, термоустойчивостью или термолабильностью компонентов. Такие легко разрушающиеся субстраты, как молоко или желатиновые среды, а также субстраты, содержащие сахара,

витамины (пивное сусло, соки, дрожжевой автолизат и др.) обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15 – 30 мин. Мясопептонные среды можно стерилизовать при 1,0 атм 20 мин. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поэтому их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при 160 °С в течение 2 или 1 ч при 170 °С. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см. После автоклавирования среды для проверки стерильности выдерживают 2 – 3 сут в термостате при 30 °С. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново.

Дробная стерилизация (тиндализация) и пастеризация

Тиндализация, дробная стерилизация, была предложена в 1877 г. Тиндалем. Она применяется для сред, портящихся под действием температур выше 100 °С. Тиндализацию осуществляют текучим паром в автоклаве с незавинченной крышкой или в аппарате Коха. Среды прогревают несколько раз по 10 – 15 мин. Между прогреваниями среды ставят в термостат при температуре 30 °С на 8 – 12 ч для прорастания жизнеспособных спор. Среды, не выдерживающие нагревания при 100 °С, прогревают более осторожно при 60 – 80 °С через каждые 8 – 12 ч 4 – 5 дней подряд.

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100 °С известен под названием **пастеризация**. Этот метод, предложенный Пастером, предназначен для уничтожения только бесспорных форм микроорганизмов. Следовательно, в подавляющем большинстве случаев он не обеспечивает стерильности. Пастеризацию проводят при 60 – 80 °С 10 – 30 мин. Этот процесс используют в пищевой промышленности для обработки молока, фруктовых соков, вина, пива и др.

Стерилизация фильтрованием

Фильтрованием стерилизуют синтетические среды строго определенного состава, которые содержат легкоразрушающиеся или летучие компоненты – витамины, аминокислоты (цистеин и цистин), белки, углеводы, антибиотики и др. Фильтрование жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и др.

Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,20 мкм. Наиболее широкое распространение в

8

микробиологической практике получили мембранные фильтры, которые в зависимости от величины пор применяют для фильтрования и стерилизации. Для стерилизации используют отечественные фильтры фирм «Владипор», «Владисарт» с диаметром пор 0,20 мкм.

Плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой, называются фильтрами Зейтца. В зависимости от диаметра пор они обозначаются разными индексами. Стерилизующими являются СФ-3 и СФ-4.

Мембранные фильтры стерилизуют автоклавированием при 1 атм 15 мин или длительным кипячением.

Стерилизация стеклянной посуды. Основным способом стерилизации стеклянной посуды является обработка ее сухим горячим воздухом при температуре не выше 180 ° в течение 1 – 3 ч (табл. 2). При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Стерилизацию осуществляют в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации и обеспечивающих автоматическое поддержание необходимой температуры.

Таблица 2

Время, необходимое для стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

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

Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. После этого её загружают в стерилизатор (или в сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный надежный прогрев стерилизуемого материала. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80 °С, так как при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться.

Стерилизация инструментов и приборов. Мелкие металлические инструменты – петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели – стерилизуют прокаливанием в пламени (т.е. нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при посевах культур и разливе сред. В пламени погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Шприцы лучше всего стерилизовать сухим жаром при 160 °С либо в собранном, либо в разобранном виде. В первом случае длительность стерилизации 75, во втором – 60 мин. Собранные шприцы вместе с иглой стерилизуют в пробирке, закрытой ватной пробкой, разобранные заворачивают в бумагу или ткань. Можно стерилизовать шприцы и в автоклаве при 1 атм в течение 15 – 20 мин. Автоклавировать их только в разобранном виде, иначе они повреждаются.

Стерилизация газообразными веществами. Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например центрифужные пробирки, стерилизуют газовым методом. Для газовой стерилизации применяются только те соединения, которые обладают спороцидными свойствами. Это оксид этилена, метилбромид, оксид пропилена, формальдегид, глутаральдегид, бета-пропиолактон, озон и др. Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. Стерилизуемые объекты, помещаемые в камеру, упаковывают как при стерилизации в автоклаве или сушильном шкафу. При проведении газовой стерилизации строго соблюдают правила работы с ядовитыми газообразными веществами.

Стерилизация облучением

Для стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов используют различные виды излучений: инфракрасное, ультрафиолетовое, рентгеновские лучи, α -, β - и γ -лучи радиоактивных элементов. Чаще других в микробиологической практике используют ультрафиолетовое облучение. Мощность ультрафиолета измеряется в бактах. Доза УФ-излучения, губительная для различных видов микроорганизмов (кроме спор), составляет 5 мкб/см².

Лабораторная работа № 1

Оборудование микробиологической лаборатории и подготовка посуды к стерилизации

Цель работы. Ознакомление с правилами работы в микробиологической лаборатории, с особенностями подготовки помещения, оборудования и лабораторной посуды к работе с микроорганизмами.

Материалы и оборудование: термостат, центрифуги, автоклав, сушильный шкаф, фильтры, бактерицидные лампы, пипетки, чашки Петри, шпатели, пробирки, колбы, предметные стекла, пергаментная бумага, вата, марля.

Ход выполнения работы. Ознакомьтесь с устройством и применением основных приборов и оборудования микробиологической лаборатории. В соответствии с описанием этого процесса в теоретической части выполните следующие действия, а именно подготовьте к стерилизации:

- 1) стеклянную посуду: пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри;
- 2) ватно-марлевые и резиновые пробки, металлические инструменты (ножницы, пинцеты, шприцы и иглы);
- 3) фильтровальную установку «Владисарт» и мембранные фильтры.

3. Методы приготовления препаратов для микроскопии

Микроскопия

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величина которых измеряется в большинстве случаев микрометрами ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм} = 10^{-6} \text{ м}$), возможно только с помощью микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световая микроскопия) и десятки тысяч (электронная микроскопия) раз. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные элементы его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст). Световая микроскопия включает в себя обычную просвечивающую микроскопию (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную.

Светлопольная микроскопия. Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов, которые позволяют определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также характерную для микроорганизмов способность к дифференцирующему окрашиванию.

Правила пользования микроскопом. Строгое соблюдение правил пользования микроскопом является непременным условием для каждого работающего с ним. При работе необходимо соблюдать следующую последовательность:

1. Устанавливают микроскоп в рабочее положение, т.е. так, чтобы колонка была обращена в сторону исследователя, а зеркало – в направлении источника света.

2. Ставят под тубус, пользуясь револьвером, объектив малого увеличения. Как правило, предмет рассматривают вначале при малом увеличении.

3. Проверив, открыта ли диафрагма и поднят ли конденсор, вращают, глядя в окуляр, зеркало и устанавливают его так, чтобы поле зрения оказалось хорошо освещенным.

4. Помещают препарат на предметный столик микроскопа так, чтобы рассматриваемый объект оказался над отверстием столика. Препарат закрепляют с помощью клемм.

5. Находят фокусное расстояние, для чего опускают или поднимают тубус с помощью макрометрического винта. Для окончательной фокусировки пользуются микрометрическим винтом.

При смене объектива, дающего малое увеличение, на объектив большего увеличения требуется соблюдение следующих правил:

1. Прежде чем сменить объектив, рассматриваемый объект (или его участок) ставят в центре поля зрения микроскопа при малом увеличении. Диаметр линзы уменьшается по мере возрастания степени увеличения, вследствие чего объект, если он лежит не в центре, при смене объектива может оказаться за пределами поля зрения.

2. Слегка приподнимают тубус и затем переводят объектив с помощью револьвера. Это необходимо потому, что объектив большего увеличения всегда бывает длиннее.

3. Для того чтобы в поисках фокусного расстояния не раздавить препарат или, что еще хуже, не повредить линзу объектива, тубус с подведенным под него объективом, глядя для контроля сбоку микроскопа, опускают

до самой поверхности препарата и затем, смотря в окуляр, очень медленно (чтобы не пропустить появления очертаний предмета) поднимают.

Рассматривают препарат в микроскоп левым глазом. Правый глаз при этом должен оставаться открытым. Левую руку держат на микрометрическом винте и слегка вращают его (влево и вправо). Этим достигается возможность рассмотрения поверхностных и более глубоких участков объекта. Правой (свободной) рукой делают зарисовку того, что видно в поле зрения.

Правила работы с иммерсионным объективом. Сухой окрашенный препарат (приготовление см. ниже) помещают на столик микроскопа и, пользуясь объективом 8×, устанавливают свет. Затем в центр препарата на мазок наносят каплю иммерсионного масла и заменяют сухую систему иммерсионной. С помощью макрометрического винта опускают тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Эту операцию нужно проводить очень осторожно, следя сбоку за тем, чтобы фронтальная линза не коснулась предметного стекла и не получила повреждения. После погружения объектива в масло осторожно, также пользуясь макровинтом, поднимают тубус и, наблюдая в окуляр, находят плоскость препарата. Точная фокусировка достигается с помощью микрометрического винта.

По окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной ксилолом. Оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксированию пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа.

Изучение микроорганизмов в световом микроскопе. Выбор методов микроскопического анализа и способов окраски определяется конкретной целью исследования.

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2 – 1,4 мм. Применение более толстых стекол не позволяет получить резкое изображение краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу. Это достигается протиранием стекол ватой, смоченной эфиром (после этого промывание водой не требуется), или обжиганием поверхности стекол в пламени горелки (жир при этом сгорает).

Покровные стекла, применяемые для приготовления препаратов микроорганизмов, также должны быть тщательно вымыты и высушены. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15 – 0,17 мм. Более толстые покровные стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

Препараты живых клеток микроорганизмов

1. *«Раздавленная капля»*. На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей, выращенные в жидкой среде – стерильной пипеткой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой.

2. *«Висячая капля»*. Каплю суспензии микроорганизмов петлей наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна висеть свободно, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. Для длительных наблюдений используют стерильные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят на жидкой питательной среде.

Препараты фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

1. *Приготовление мазка*. На обезжиренное спиртом предметное стекло помещают маленькую каплю водопроводной воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала как для препарата «раздавленная капля». Полученную суспензию равномерно размазывают петлей на площади 1 – 2 см² возможно более тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонок, чтобы высыхал после приготовления.

2. *Высушивание мазка*. Лучше всего сушить готовый препарат при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает быстро. Если высушивание мазка замедлено, то препарат можно

слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить осторожно, не перегревая мазку, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

3. *Фиксация препарата* преследует несколько целей: убить микроорганизмы, то есть сделать безопасным дальнейшее обращение с ними; обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу; сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые. Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегревать мазок, так как при этом происходят грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например их сморщивание. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами. Фиксирующую жидкость наливают на мазок, либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксатором.

4. *Окраска.* Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают простые и дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов. При простой окраске прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальная окраска предполагает окрашивание не всей клетки, а определенных ее структур. С помощью дифференциальной окраски выявляют некоторые клеточные структуры и запасные вещества.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Для получения более чистых препаратов краситель наливают на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо растворов красителей фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки микроорганизмов. Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться длительное время. Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

Лабораторная работа № 2

Устройство биологического микроскопа, типы микроскопии и правила пользования иммерсионным объективом микроскопа

Цель работы. Изучить устройство биологического микроскопа, различных типов микроскопии, правила пользования иммерсионным объективом микроскопа.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, пергамент, готовые препараты для микроскопии, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы. В соответствии с описанием в теоретической части выполните следующие задания:

1. Вспомните устройство светового микроскопа и правила работы с ним.
2. Рассмотрите под иммерсионным объективом готовые препараты фиксированных и окрашенных бактерий в последовательности указанной, преподавателем.
3. Зарисуйте изученные препараты.

Лабораторная работа № 3

Приготовление прижизненных препаратов клеток микроорганизмов

Цель работы. Освоить методы приготовления препаратов живых клеток микроорганизмов для микроскопии.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³,

дистиллированная вода, чистая культура микроорганизмов, красители (метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), готовые препараты для микроскопии.

Ход выполнения работы. В соответствии с описанием методов приготовления препаратов в теоретической части выполните следующие задания:

1. Приготовьте препарат «раздавленная капля», изучите и зарисуйте в альбом.
2. Приготовьте препарат «висячая капля», изучите и зарисуйте в альбом.

Лабораторная работа № 4

Препараты фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов

Цель работы. Освоить методы приготовления фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов для микроскопии.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, пергамент, чистая культура микроорганизмов, красители (метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы. В соответствии с описанием приготовления фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов в теоретической части выполните следующие задания:

1. Приготовьте препарат фиксированных окрашенных клеток бактерий *E.coli*.
2. Изучите препарат и зарисуйте его в альбом.

Контрольные вопросы

1. Какую популяцию микроорганизмов называют чистой?
2. Какую популяцию микроорганизмов называют смешанной?
3. Какие требования предъявляют к помещениям микробиологической лаборатории?
4. Какие помещения входят в состав микробиологической лаборатории и каково их назначение?
5. Что такое «дезинфекция» и с какими целями ее применяют?
6. Какими методами и растворами дезинфицируют пол, стены и мебель?
7. Как дезинфицируют воздух в лаборатории?
8. Подготовка рабочего места и правила поведения в лаборатории.
9. Что такое посев (или инокуляция) микроорганизмов и каковы правила посева?
10. Как обрабатывают посуду после использования в работе с микроорганизмами?
11. Что такое стерилизация и какие виды стерилизации существуют?
12. Автоклавирование (принцип метода).
13. Подготовка сред к стерилизации.
14. Выбор режима автоклавирования.
15. Дробная стерилизация (тиндализация) и пастеризация.
16. Стерилизация фильтрованием. Виды фильтров.
17. Стерилизации стеклянной посуды.
18. Стерилизация инструментов и приборов.
19. Стерилизация газообразными веществами.
20. Стерилизация облучением.
21. Какие виды микроскопии Вы знаете?
22. Светлопольная микроскопия.
23. Правила работы с микроскопом.
24. Правила смены объектива микроскопа.
25. Изучение микроорганизмов в световом микроскопе.
26. Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов.
27. Препараты фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов (фиксация и высушивание мазка).
28. Красители и окраска препаратов.

II. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСРЕДСТВОМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

1. Морфология бактерий

Бактерии бывают шаровидные, палочковидные, извитые и ветвящиеся.

Кокки – шаровидные клетки, которые в зависимости от взаимного расположения делятся на микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины, стафилококки. Микрококки располагаются в виде отдельных клеток: диплококки, или парные кокки, – парами (пневмококк, гонококк, менингококк), так как клетки после деления не расходятся. Стрептококки (от греч. streptos – цепочка) – клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку вследствие деления клеток в одной плоскости и сохранения связи между ними в месте деления. Сарцины (от лат. sarcina – связка, тюк) располагаются в виде пакетов из 8 и более кокков, так как они образуются при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных областях. Стафилококки (от греч. staphyle – виноградная гроздь) представляют собой кокки, расположенные группами (гроздьями) в результате деления в разных плоскостях.

Палочковидные бактерии различаются по размерам, форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Длина клеток варьирует от 1 до 8 мкм, толщина – от 0.5 до 2 мкм. Палочки могут быть правильной (кишечная палочка и др.) и неправильной (коринебактерии и др.) формы, в том числе ветвящиеся, например актиномицеты. Наиболее мелкие палочковидные бактерии - риккетсии. Концы палочек могут быть как бы обрванными (сибиреязвенная бацилла), закругленными (кишечная палочка), заостренными (фузобактерии) или в виде утолщения, и тогда палочка похожа на булаву (коринебактерии дифтерии).

Слегка изогнутые палочки называют **вибрионами** (холерный вибрион). Большинство палочковидных бактерий располагается беспорядочно, так как после деления клетки расходятся. Если после деления клетки остаются связанными общими фрагментами клеточной стенки и не расходятся,

они располагаются под углом друг к другу (коринебактерии дифтерии), образуют цепочку (сибиреязвенная бацилла).

Извитые формы – спиралевидные бактерии, например **спириллы**, имеющие вид штопорообразно извитых клеток. К патогенным спириллам относится возбудитель содоку (болезни укуса крыс), к извитым – кампилобактеры, имеющие изгибы, как у крыла летящей чайки; близки к ним и такие бактерии, как спирохеты, имеющие ряд отличительных особенностей.

Спирохеты – тонкие, длинные, извитые (спиралевидной формы) бактерии, отличающиеся от спирилл подвижностью, обусловленной «сгибательными» изменениями клеток. Они плохо воспринимают красители. Обычно спирохеты окрашивают по методу Романовского-Гимзы или серебрением. В живом виде их исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

Риккетсии – мелкие грамтрицательные палочковидные бактерии размером 0.35 – 1 мкм; облигатные внутриклеточные паразиты. Форма и размер риккетсий могут меняться (клетки неправильной формы, нитевидные) в зависимости от условий роста. В мазках и тканях их окрашивают по методу Романовского-Гимзы или по П.Ф. Здродовскому.

Актиномицеты – ветвящиеся грамположительные бактерии. Свое название (от греч. actis – луч, mykes – гриб) они получили в связи с возникновением в пораженных тканях друз-гранул из плотно переплетенных нитей в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями. Актиномицеты, как и грибы, образуют мицелий – нитевидные переплетающиеся клетки (гифы). Они формируют субстратный мицелий, появляющийся в результате вставания мицелия в питательную среду, и воздушный, растущий на поверхности среды.

2. Морфология грибов

Грибы (Fungi, Mycetes) – разнородная группа эукариотических микроорганизмов. Грибы имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану (которая содержит фосфолипиды и стеролы) и мощную клеточную стенку из глюкана, целлюлозы, хитина, белка, липидов и др. Грибы состоят из длинных тонких нитей (гиф), сплетающихся в грибницу, или мицелий. Гифы низших грибов – фикомицетов – не имеют перегородок. У высших грибов – эумицетов – гифы раз-

делены перегородками; их мицелий многоклеточный. Эумицеты представлены аскомицетами и базидиомицетами (совершенные грибы), а также дейтеромицетами (несовершенные грибы).

К аскомицетам относятся представители родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др. Представителями аскомицетов являются и дрожжи – одноклеточные грибы, утратившие способность к образованию истинного мицелия. Дрожжи имеют овальную форму клеток, диаметр которых 3 – 15 мкм. Они размножаются почкованием, бинарным делением (делятся на две равные клетки) или половым путем с образованием аскоспор.

3. Морфология простейших

Простейшие – эукариотические одноклеточные микроорганизмы, составляющие подцарство Protozoa царства животных (*Animalia*). Размеры простейших колеблются в среднем от 5 до 30 мкм. Снаружи клетки простейших окружены мембраной (пелликулой) – аналогом цитоплазматической мембраны клеток животных. Некоторые простейшие имеют опорные фибриллы. Цитоплазма и ядро соответствуют по строению эукариотическим клеткам. Передвигаются простейшие посредством жгутиков, ресничек и путем образования псевдоподий. Простейшие могут питаться в результате фагоцитоза или образования особых структур. Многие простейшие при неблагоприятных условиях образуют цисты – покоящиеся стадии, устойчивые к изменению температуры, влажности и др. Простейшие окрашиваются по Романовскому-Гимзе (ядро – красного цвета, цитоплазма – синего).

Лабораторная работа № 5

Морфология бактерий

Цель работы. Изучить морфологию различных бактериальных клеток, некоторые методы окраски микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, чистые культуры бактерий, красители (кристал-

лвиолет, фуксин Циля, метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), раствор Люголя, этиловый спирт, готовые препараты бактерий, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Просмотрите готовые препараты фиксированных окрашенных бактерий, изучите их и зарисуйте в альбом.

2. Приготовьте препараты фиксированных окрашенных шаровидных клеток бактерий (род *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), изучите и зарисуйте в альбом.

3. Приготовьте препараты фиксированных окрашенных палочковидных клеток бактерий (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), изучите и зарисуйте в альбом.

Лабораторная работа № 6

Морфология спирохет

Цель работы. Изучить морфологию спирохет, выявляемых в препарате из зубного налёта, окрашенном негативным методом по Бурри.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, стерильные палочки, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, черная тушь, этиловый спирт, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте мазок из зубного налета, взятого стерильной палочкой. Нанесите на сухой мазок раствор негативного красителя (жидкая тушь, конго красный), высушите.

2. Можно приготовить препарат вторым способом: каплю исследуемой суспензии бактерий смешать с красителем непосредственно на предметном стекле, накрыть её покровным стеклом.

3. Сухой препарат (или приготовленный вторым способом) рассмотрите под иммерсией.

4. Зарисуйте: на темном фоне туши видны неокрашенные большая и малая зубные спирохеты – *Spirochaeta macrodenta* и *Spirochaeta microdenta*.

Лабораторная работа № 7

Морфология споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов

Цель работы. Ознакомиться с морфологией споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, готовые препараты споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Просмотрите готовые препараты микроорганизмов с иммерсионной системой.
2. Зарисуйте каждый препарат в альбом.

Лабораторная работа № 8

Морфология дрожжевых грибов

Цель работы. Изучить морфологию клеток дрожжевых грибов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, столик для окраски мазков, пипетки объемом 1 и 2 см³, дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, красители (кристаллиолет, фуксин Циля, метиленовый синий, основной фуксин, карболовый фуксин, малахитовый зеленый), раствор Люголя, этиловый спирт, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте мазок из чистой культуры дрожжей.
2. Окрасьте фиксированный мазок по Грамму.
3. Полученный препарат рассмотрите под иммерсией.
4. Зарисуйте в альбом.

4. Морфология клеточных структур

Клеточная стенка. Тонкую структуру клеточной стенки хорошо видно лишь в электронном микроскопе. Для наблюдения клеточной стенки в световом микроскопе применяют метод темного поля либо специальную окраску, с помощью которой удастся легко выявить границы между отдельными клетками, расположенными в виде длинных нитей или плотных агрегатов. На обезжиренном стекле делают мазок клеток исследуемых бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 5 мин 5%-ным раствором фосфомолибденовой кислоты. Затем препарат промывают водой и окрашивают не более 15 мин 0,02%-ным раствором кристаллвиолета. Снова промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клеточная стенка окрашивается в черный цвет, а цитоплазма – в бледно-сиреневый.

Выявление кислотоустойчивости. Кислотоустойчивость – свойство, характерное для некоторых микобактерий и нокардий. Оно заключается в сохранении окраски клетками этих бактерий при обработке их кислотой. Наибольшее распространение получил способ выявления кислотоустойчивости по Циль-Нильсену. На обезжиренном предметном стекле готовят два мазка: исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых микобактерий. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препарат карболовым фуксином Циля и затем 2 – 3 раза подогревают его до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку, и при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. После этого препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой. Затем препарат обесцвечивают 5%-ным раствором H_2SO_4 . Для этого предметное стекло погружают 2 – 3 раза в стакан с кислотой, не задерживая его в ней. Препарат вновь тщательно промывают водой и докрашивают 3 – 5 мин метиловым синим по Леффлеру. Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и исследуют с иммерсионной системой. При строгом соблюдении режима окраски кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, тогда как некислотоустойчивые – синий.

Нуклеоид. Довольно четко нуклеоид обнаруживается у следующих бактерий: *Proteus vulgaris*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*,

Bacillus mycoides, *Bacillus subtilis*. На предметном стекле делают мазок суточной культуры бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 2 – 3 мин в парах осмиевой кислоты. С этой целью на дно чашки Петри наносят 2 – 3 капли фиксатора, а предметное стекло помещают мазком вниз на обрезки стекла. По окончании фиксации препарат опускают на 2 – 3 мин в стаканчик с раствором 1 н. HCl для гидролиза рибосомальной РНК. Стакан держат на водяной бане при 60 °С. После гидролиза препарат немедленно промывают водой. Затем мазок помещают на 15 мин в 1%-ный раствор формалина, вновь промывают водой и окрашивают в течение 1 – 2 мин 0,1 – 1,0%-ным раствором основного фуксина. Препарат промывают, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет, нуклеоид – в ярко-малиновый.

Эндоспоры. Эндоспоры образуют бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium* и некоторых других. Для обнаружения способности клеток к спорообразованию лучше использовать старые культуры. Споры можно обнаружить при наблюдении живых клеток, а также путем дифференциального окрашивания цитоплазмы и споры. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования (бациллярный, клостридиальный, плектридиальный), расположение споры в клетке (центральное, эксцентральное или полярное), форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая) и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2 – 3-суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры.

Наблюдение спор в живых клетках. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры имеют вид светлых включений на фоне почти черных клеток.

Метод выявления спор негативным окрашиванием. На предметном стекле готовят тонкий мазок клеток спорулирующих бактерий, подсушивают на воздухе и фиксируют в пламени. Затем на 3 – 5 мин наносят метиленовый синий или на 1 – 3 мин фуксин, после чего препарат осторожно просушивают на воздухе. Просматривают с иммерсией.

Вегетативные клетки бактерий прокрашиваются, а споры, имеющие многослойную, труднопроницаемую оболочку – нет. Они видны как сильно преломляющие свет сферические или овальные образования, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий.

Метод удобен при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста бактерий.

Дифференциальная окраска споры по методу Пешкова. Споры и цитоплазму окрашивают при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

На обезжиренном предметном стекле готовят мазок, высушивают его на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания красителя, – 10 – 20 с. Затем предметное стекло охлаждают, препарат тщательно промывают водой, после чего клетки в течение 30 с докрашивают 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного или сафранина. Краситель сливают, препарат промывают водой и просматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании клетки имеют красный цвет, а споры – синий. Вместо метиленового синего можно использовать малахитовый зеленый. В этом случае препарат, фиксированный в пламени горелки, заливают на 7 – 10 мин 7,5%-ным раствором малахитового зеленого. Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой или над пламенем горелки. По окончании окраски предметное стекло охлаждают, промывают препарат водой и докрашивают клетки 0,25%-ным водным раствором сафранина в течение 1 – 2 мин. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в розовый.

Окраска капсулы. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток. Химический состав капсул у разных бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски. Кроме того, капсулы при окраске легко деформируются, а вещество капсулы слабо связывает краситель, который легко отмывается в процессе обработки препарата. Чаще всего для выявления капсул применяют способ «негативной» окраски (негативного контрастирования) с помощью жидкой туши. Для этого небольшое количество

клеток с плотной среды помещают в каплю разбавленного фуксина, смешивают с каплей туши, закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом 40×. На общем темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки микроорганизмов, окрашенные в розовый цвет.

Окраска капсул по методу Гинса. На конец предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю черной туши, вносят в нее клетки, хорошо перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют 5 – 10 мин смесью Никифорова или 3 мин абсолютным метанолом. Далее мазок окрашивают карболовым фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3. Время окрашивания – 2 – 3 мин. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой. На темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Окраска по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда все бактерии делятся на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином или сафранином они приобретают розовую окраску.

Окраска по Граму заключается в следующем. На одном обезжиренном стекле делают мазки разных микроорганизмов: в центре – мазок клеток исследуемой культуры, слева и справа – контрольных культур. Клетки одной контрольной культуры должны быть грамположительными (например *Micrococcus luteus* или *Bacillus cereus*), другой – грамотрицательными (например *Escherichia coli*). Мазки следует готовить тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1 – 2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым. Затем краситель сливают и, не промывая мазок водой, обрабатывают его 1 – 2 мин раствором Люголя до почернения. Сливают раствор Люголя, препарат обесцвечивают 0,1 – 1,0 мин 96%-ным этиловым спиртом, быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 1 – 2 мин водным фуксином. Краситель сливают, препарат промывают

вают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют синевато-фиолетовый цвет, грамотрицательные – розово-красный.

Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов. Метод основан на разрушении клеток грамотрицательных бактерий в щелочной среде и определении свободной ДНК. Для этого на предметное стекло наносят каплю 3%-ного раствора КОН и 1 петлю 24-часовой исследуемой агаровой культуры, тщательно перемешивают. При тестировании грамотрицательных культур через 5 – 7 с при движении петли вверх образуется слизистый след длиной 1 – 2 см; если слизь не образуется, то тестируемая культура грамположительная.

Лабораторная работа № 9

Окраска бактерий по Граму

Цель работы. Ознакомиться с техникой окраски бактерий по Граму.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, чистые предметные стекла, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, красящая бумага с кристаллвиолетом или 1%-ный раствор кристаллвиолета или генцианвиолета, раствор Люголя, 96%-ный этанол, 0,1%-ный раствор фуксина или раствор Пфейфера, чистые культуры контрольных (с известным типом окраски) грамположительных и грамотрицательных бактерий и исследуемые микроорганизмы, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте на одном предметном стекле три фиксированных мазка бактерий: а) контрольной грамотрицательной культуры с одного конца стекла; б) контрольной грамположительной культуры с другого конца стекла и в) исследуемой культуры в центре стекла. Мазки должны быть тонкими, клетки бактерий должны быть равномерно распределены на стекле, иначе окрашивание будет неправильным.

2. Мазки окрашивают кристаллвиолетом в течение 2 мин.

3. Кристаллвиолет смывают раствором Люголя и заливают мазки этим же раствором на 2 мин.

4. Раствор Люголя смывают и окрашенные мазки обесцвечивают 96%-ным этиловым спиртом, погружая стекло с мазками в стакан со спиртом на 30 с или промывая стекло спиртом из пипетки в течение 30 с.

5. Тщательно промывают стекло с мазками водой (предпочтительно дистиллированной) и наносят на стекло 0,1%-ный раствор фуксина или раствор Пфейфера.

6. Через 2 мин краску сливают, стекло тщательно промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют, пользуясь иммерсионным объективом. Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в красный или розовый цвет дополнительного красителя (фуксина).

7. Зарисуйте каждый препарат в альбом.

Лабораторная работа № 10

Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов

Цель работы. Ознакомиться с техникой определения грам-типа микроорганизмов.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, спиртовка, чистые предметные стекла, чистые культуры контрольных (с известным типом окраски) грамположительных и грамотрицательных бактерий и исследуемые микроорганизмы, раствор 3%-ного КОН.

Ход выполнения работы

1. На одно предметное стекло нанесите две капли раствора 3%-ного КОН. В первую каплю внесите бактериологической петлей контрольную грамположительную культуру, а во вторую – грамотрицательную контрольную культуру.

2. Тщательно перемешайте грамположительную культуру в первой капле с раствором КОН, через 5 – 10 с медленно приподнимите бактериологическую петлю и убедитесь, что вязкость капли не изменилась, то есть слизь не образуется и реакция отрицательная.

3. Тщательно перемешайте грамотрицательную культуру во второй капле с раствором КОН и через 5 – 10 с медленно приподнимите бактериологическую петлю на высоту 2 – 3 см. Образовавшаяся слизь свидетельствует о том, что КОН разрушает бактериальную клеточную стенку и ДНК

остается свободной (слизистое образование), т.е. проба положительная, а культура является грамотрицательной.

4. Определите экспресс-методом грам-тип культур, предложенных преподавателем.

Лабораторная работа № 11

Окраска капсул бактерий по методу Гинса

Цель работы. Освоить окраску капсул бактерий по методу Гинса.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, спиртовка, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, полоски фильтровальной бумаги, черная тушь, смесь Никифорова, карболовый фуксин Циля, дистиллированная вода, чистые культуры бактерий, готовые препараты капсульных форм бактерий, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте препарат в соответствии с описанием в теоретической части.
2. Просмотрите готовые препараты, предложенные преподавателем, с иммерсионной системой и зарисуйте их в альбом.
3. Просмотрите приготовленный Вами препарат с иммерсионной системой и тоже зарисуйте его в альбом.

Лабораторная работа № 12

Окраска спор бактерий

Цель работы. Освоить метод окраски спор бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, 0,5%-ный водный раствор сафранина, раствор метиленового синего по Леффлеру или малахитовый зеленый, дистиллированная вода, чистые культуры спорообразующих бактерий (*Bacillus subtilis*,

Bacillus cereus), готовые препараты споровых форм бактерий, иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте фиксированный мазок чистой культуры спорообразующих бактерий.
2. Налейте на предметное стекло с мазком один из красителей: раствор метиленового синего по Леффлеру или малахитового зеленого.
3. Зажгите спиртовку и, держа стекло пинцетом над пламенем горелки, доведите краситель до кипения. По мере испарения красителя добавляйте новые его порции. Продолжительность окраски трехкратная по 10 – 15 с.
4. Затем стекло охладите, препарат тщательно промойте водой и нанесите на мазок 0,5%-ный водный раствор сафранина и в течение 30 с докрасьте препарат.
5. Снова препарат промойте водой и высушите фильтровальной бумагой.
6. Просмотрите с иммерсионной системой готовый препарат споровой культуры, представленный преподавателем.
7. Просмотрите с иммерсионной системой препарат споровой культуры, полученный Вами.
8. Все препараты зарисуйте в альбом. При правильном окрашивании вегетативные клетки окрашиваются в красный цвет, а споры в синий (при окрашивании раствором метиленового синего по Леффлеру) или в зеленый (при окрашивании раствором малахитового зеленого).

Контрольные вопросы

1. Что такое капсула, каковы ее химический состав, морфология и функции?
2. Методы окраски бактериальных капсул.
3. Методы окраски клеточной стенки.
4. Окраска бактерий по Граму.
5. Окраска бактерий для определения их кислотоустойчивости.
6. Методы окраски нуклеоида у бактерий.
7. Спорообразование у бактерий, строение спор, расположение в клетке и их функции.
8. Окраска спор.

III. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Основные компоненты питательных сред

Культивирование микроорганизмов является одним из основных методов микробиологии. От умения культивировать микроорганизмы в лабораторных условиях в значительной степени зависят успехи их изучения и практического применения.

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируют на питательных средах, поэтому питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения **углерода** и **азота**. По потребностям в углероде микроорганизмы принято делить на две большие группы – **автотрофы** и **гетеротрофы**.

Для развития гетеротрофных микроорганизмов среда должна содержать органические соединения в зависимости от их индивидуальных особенностей: кислоты, спирты, углеводороды, ароматические соединения.

Вторым основным компонентом питательной среды является источник азота. Питательные среды для культивирования некоторых микроорганизмов должны включать одну, несколько или полный набор аминокислот в концентрации от 0,1 до 0,05 г на 100 мл. Потребности микроорганизмов в некоторых аминокислотах часто удовлетворяют добавляя к среде гидролизат белка.

Многие микроорганизмы требуют наличия в среде факторов роста, к которым относятся витамины, пурины, пиримидины и аминокислоты. Чтобы подчеркнуть потребность микроорганизмов в факторах роста, принято использовать термины «**прототрофы**» и «**ауксотрофы**». Прототрофы не нуждаются в факторах роста, для ауксотрофов абсолютно необходимо наличие в среде одного или нескольких факторов роста.

Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, а также кукурузный экстракт. Дрожжевой экстракт вносят в среду для культивирования от 0,05 до 0,5 г на 100 мл, дрожжевой автолизат – в таком количестве, чтобы концентрация аминного азота составляла 5 – 30 мг на 100 мл среды.

По составу принято выделять естественные, или **натуральные**, среды и **синтетические среды**.

Натуральными называют среды, в состав которых входят продукты животного или растительного происхождения. К таким средам относятся овощные или фруктовые соки, животные ткани, разведенная кровь, молоко, воды морей, озер и минеральных источников, отвары или экстракты, полученные из природных субстратов, таких как мясо, почва, навоз, различные части растений, клетки микроорганизмов.

Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенный экстракт.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) представляет собой мясную воду, к которой добавляют 1% пептона и 0.5% NaCl. МПБ – богатая питательная среда, но она почти не содержит углеводов. В случае необходимости их добавляют к МПБ чаще всего в количестве 1 – 2 г на 100 мл. МПБ стерилизуют при 1 атм.

Синтетические среды – это среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Синтетические среды широко используют при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов, для разработки состава синтетических сред, обеспечивающих рост микроорганизмов или усиленный биосинтез какого-либо продукта жизнедеятельности. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть и довольно простыми по составу.

Наряду с натуральными и синтетическими средами выделяют так называемые **полусинтетические среды**. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и т.д. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой автолизат, почвенный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

2. Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды

Эти среды дают возможность быстро отличить одни виды бактерий от других или выявить некоторые их особенности. Примером индикаторной среды для выявления бактерий из группы кишечной палочки в естественных субстратах может служить агаризованная среда Эндо, в состав которой включен 10%-ный спиртовой раствор основного фуксина. Бактерии рода *Escherichia* на этой среде образуют малиновые колонии с металлическим блеском.

Дифференциально-диагностические среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

По физическому состоянию различают *жидкие, сыпучие и плотные* среды. Жидкие среды широко применяются для накопления биомассы или продуктов обмена, исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, а также поддержания и сохранения в коллекции культур микроорганизмов. Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений, а также в коллекциях для сохранения культур микроорганизмов. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби. Плотные среды используют для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, определения количества микроорганизмов, их антибиотической активности, для хранения культур в коллекциях и в ряде других случаев. С целью уплотнения сред применяют желатину или агар.

Агар используют для уплотнения особенно часто. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Агар получают из некоторых морских водорослей и выпускают в виде пластин, стебельков или порошка. Агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при 100 °С и затвердевает при 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать значительную часть известных микроорганизмов. Чаще всего агар добавляют к средам в количестве 1,5 %. Если необходимо получить более влажную среду, вносят 1,0 %, а более плотную и сухую – 2 – 3 % агара.

3. Условия культивирования микроорганизмов

Для роста микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как **кислотность среды, аэрация, температура, свет, влажность**. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто не одинаковы.

Активная кислотность среды (pH) имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше всего растет при pH, близком к 7,0, напротив, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среды. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определить значение pH. Значение pH сред может измениться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести до нужного, если это требуется, стерильными растворами кислоты или щелочи.

В процессе культивирования микроорганизмов кислотность питательной среды часто меняется. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных компонентов среды. Поддержание определенного значения pH во время роста особенно важно для тех микроорганизмов, которые образуют в процессе жизнедеятельности кислоты, но не обладают устойчивостью к ним. К их числу относятся молочно-кислые бактерии, а также многие псевдомонады.

Аэрация. По типу дыхания бактерии разделяют на 4 группы: а) облигатные, или строгие, аэробы, которые могут расти только при наличии кислорода; б) микроаэрофилы, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении O_2 меньшем, чем в воздухе; в) факультативные анаэробы, которые способны расти как в присутствии, так и в отсутствии молекулярного кислорода (например, некоторые дрожжи или энтеробактерии в зависимости от наличия кислорода осуществляют аэробное дыхание или брожение; г) облигатные анаэробы (клостридии ботулизма, газовой гангрены, столбняка, бактериоиды и др.) растут только на среде без кислорода, который для них токсичен. Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия и в способах их культивирования.

Температура. Интервалы температур, в которых возможен рост различных микроорганизмов, заметно варьируются. У мезофилов, к которым относится большинство известных бактерий, температурный оптимум ле-

жит в интервале 25 – 37 °С. У термофилов он значительно выше – от 45 до 80 – 90 °С. Психрофилы хорошо развиваются в интервале температур 5 – 10 °С. Отклонения температуры от оптимальной неблагоприятно влияют на развитие микроорганизмов. Поэтому мезофильные микроорганизмы выращивают в термостатах или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура.

Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры.

Периодическое и непрерывное культивирование. Существуют две принципиально разные системы выращивания микроорганизмов в жидкой среде. В одном случае после инокуляции среды не происходит ни добавления в нее, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы. Такая закрытая система культивирования носит название периодической и может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени, на протяжении которого меняются состав исходной среды и окружающие условия.

Непрерывное (проточное) культивирование в отличие от периодического характеризуется постоянной подачей питательной среды со скоростью, равной скорости удаления культуры. При этом объем культуры в ферментере во времени не меняется. Одно из основных условий непрерывного культивирования – хорошее перемешивание культуры в ферментере.

4. Культивирование аэробных микроорганизмов

Культивирование на поверхности плотных и жидких сред. В этом случае микроорганизмы выращивают на поверхности плотной среды или в тонком слое жидкой среды, и кислород поступает к ним непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании важно увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном – чашки Петри, колбы, матрацы и так далее, в жидких средах аэробные микроорганизмы часто растут, образуя на поверхности пленку. Факультативные анаэробы развиваются не только на поверхности, но и в толще жидкой среды, вызывая более или менее равномерное ее помутнение. Поверхностное культивирование микроорганизмов применяется как в лабораторных условиях, так и в промышленности.

Глубинное культивирование в жидких средах. Все способы глубинного культивирования аэробных микроорганизмов сводятся к увеличению поверхности соприкосновения питательной среды с кислородом воз-

духа. Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на качалках, обеспечивающих встряхивание или вращение колб или пробирок со скоростью 100 – 200 об/мин и более. Чем больше скорость вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом.

Помимо перемешивания аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием через толщу среды стерильного воздуха. Этот способ часто используют в лабораторных исследованиях, но особенно широкое применение он нашел в промышленной микробиологии при получении биомассы и различных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов – антибиотиков, ферментов, кислот.

5. Культивирование анаэробных микроорганизмов

Выращивание анаэробных организмов более сложно, чем культивирование аэробов, так как соприкосновение клеток анаэробов с кислородом воздуха должно быть сведено к минимуму или даже полностью исключено. Для этого используют разные приемы, нередко комбинируя их друг с другом.

Выращивание в высоком слое среды. Это наиболее простой способ ограничения доступа воздуха к клеткам микроорганизмов. Жидкую среду наливают в сосуды для культивирования высоким слоем. Непосредственно перед посевом среду кипятят или прогревают на кипящей водяной бане 30 – 40 мин, затем быстро охлаждают, чтобы в ней не успел раствориться кислород воздуха, и вносят на дно посевной материал.

Выращивание в толще плотной среды. Этим приемом пользуются для получения изолированных колоний при выделении чистых культур или определении численности анаэробных микроорганизмов. Посевной материал вносят в расплавленную и остуженную до 48 – 50 °С агаризованную, желательную, осветленную среду, тщательно перемешивают и оставляют в пробирках или переливают стерильной пипеткой в другую стерильную посуду (трубки Бурри или чашки Петри). Поверхность среды в пробирках или трубках Бурри заливают парафином. При использовании чашек Петри для выращивания анаэробов засеянную агаризованную среду наливают в крышку чашки и, после того как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки, где среда соприкасается с воздухом, заливают стерильным парафином.

Выращивание в анаэроостатах. Анаэробные микроорганизмы можно выращивать в анаэроостатах – вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Анаэроостатом может служить обычный вакуумный стеклянный эксикатор. Из анаэроостата откачивают воздух, а затем, как правило, заполняют его газовой смесью, состоящей из азота (90 – 80 %) и углекислоты (10 – 20 %), до давления порядка $67 \cdot 10^3$ Па (500 мм рт. ст.). Избыточное давление исключает возможность диффузии кислорода воздуха.

Лабораторная работа № 13

Культивирование бактерий на жидких и плотных питательных средах

Цель работы. Ознакомиться с ингредиентами, используемыми для питательных сред, ростом микроорганизмов на питательных средах (основных, дифференциально-диагностических, синтетических), сухими питательными средами, освоить методы посева и выращивания бактерий в жидкой и плотной питательной среде.

Материалы и оборудование. Сухие питательные среды, жидкие (МПБ, пептонная вода), плотные (МПА, среда Эндо, кровяной агар), полужидкие среды, специальные (среда Чапека для грибов), элективные (среда Китта-Тароцци для анаэробов), дифференциально-диагностические (среды Гисса с углеводами, среда Плоскирева или среда Левина), чистые культуры бактерий, выращенные на жидких, полужидких и плотных питательных средах, бактериологические петли; спиртовка; термостат с температурой 37°C ; микроскоп; столик для окрашивания препаратов; промывалка с водой; фильтровальная бумага; карболовый фуксин Циля; дистиллированная вода; иммерсионное масло для микроскопии.

Ход выполнения работы

1. Ознакомьтесь с питательными средами. Составьте таблицу классификации питательных сред по их составу, консистенции и назначению.
2. Внимательно рассмотрите характер роста различных бактерий на жидких, полужидких и плотных питательных средах, используя готовые демонстрационные посева.
3. Опишите и зарисуйте рост бактерий на различных питательных средах.
4. Сделайте посев бактерий на жидкую, полужидкую и плотную питательную среды.

Получение накопительной и чистой культур бактерий

Цель работы. Освоить метод накопительных культур и выделения чистых культур бактерий (по Коху).

Материалы и оборудование. 1 г сена или травы, 20 – 30 мл водопроводной воды, электрическая плитка или водяная баня, стерильные пробирки, пробирки с МПБ и скошенным МПА (косяки) и чашки Петри с МПА; культуры бактерий, выращенные на МПА в чашках Петри; бактериологические петли; спиртовка; термостат с температурой 37 °С.

Ход выполнения работы

1. Для получения накопительной культуры спорообразующих бактерий 1 г сена или травы поместите в колбу объемом 100 – 150 мл, налейте 20 – 30 мл водопроводной воды, подогретой до 40 – 50 °С и оставьте на 30 мин при комнатной температуре.

2. Через 30 мин воду отделите от сена, сделайте посевы на чашки Петри с МПА, оставшуюся воду разлейте в 3 – 4 пробирки по 5 – 7 мл, закройте ватно-марлевыми (или ватными) пробками, прогрейте в кипящей водяной бане 15 – 20 мин, охладите до комнатной температуры и после этого поместите чашки Петри и пробирки в термостат с температурой 37 °С на 3 – 7 сут.

3. На следующем занятии (через 3 – 7 сут) из содержимого пробирок приготовьте фиксированные мазки и окрасьте их по Граму и методом окраски спор, как описано в теоретической части. Просмотрите приготовленный Вами препарат с иммерсионной системой и зарисуйте в альбом грамположительные палочки (*Bacillus subtilis*) и эндоспores внутри бактериальных клеток.

4. Внимательно рассмотрите рост культуры в чашке Петри.

5. Выберите любую изолированную колонию на чашке с МПА. Охарактеризуйте ее: по величине (крупная – диаметром более 4 – 6, средняя – 2 – 4, мелкая – 1 – 2, точечная – меньше 1 мм); форме (округлая, амебоидная, ризоидная); оптическим свойствам (прозрачная, матовая, флуоресцирующая, полупрозрачная, непрозрачная, блестящая); цвету; поверхности (гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая); профилю (плоская, выпуклая, кратерообразная, растающая в агар); краю колонии (ровный, волнистый, лопастной, ризоидный); структуре (однородная, мелко- или крупно-

зернистая); консистенции (маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая). Характеристики колонии запишите и зарисуйте колонию в альбом.

6. Пересейте выбранную колонию в пробирки с МПА, МПБ и чашку Петри с МПА.

7. Посевы поместите в термостат с температурой 37 °С.

8. Через 24 – 48 ч просмотрите посевы на МПА. При правильном посеве все колонии должны быть однородными и по характеристикам соответствовать исходной (материнской) колонии.

9. Приготовьте фиксированный окрашенный препарат из колонии на МПБ и МПА и окрасьте его по Граму.

10. Просмотрите приготовленный Вами препарат с иммерсионной системой и тоже зарисуйте в альбом. Если в мазках из выросших посевов на МПБ и МПА бактерии однородны по морфологии и окраске, то выделенная культура является чистой.

Лабораторная работа № 15

Культивирование анаэробных культур бактерий

Цель работы. Освоить физические, химические и биологические методы удаления кислорода, ознакомиться с демонстрацией методов культивирования анаэробных бактерий.

Материалы и оборудование. Пробирки с анаэробными микроорганизмами, выросшими в глубине плотной питательной среды, пробирки со средой Кита-Тароцци с анаэробами, анаэростат, эксикатор с химическими веществами, поглощающими кислород (пирогаллол, гидросульфит натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), чашки Петри с плотной питательной средой, на которой совместно выращены аэробы и анаэробы, почва, колбы вместимостью 250 мл, стерильная вода, пипетки, среда Кита-Тароцци, спиртовки, термостат.

Ход выполнения работы

1. Внимательно просмотрите на демонстрационных посевах рост анаэробов в глубине плотных питательных сред.

2. Внимательно просмотрите на демонстрационных посевах рост бактерий в средах, содержащих редуцирующие вещества (среда Кита-Тароцци).

3. Внимательно просмотрите на демонстрационных посевах рост анаэробов в анаэростатах.

4. Внимательно просмотрите на демонстрационных посевах рост анаэробов в эксикаторе с химическими веществами, поглощающими кислород (пирогаллол, гидросульфит натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

5. Внимательно просмотрите на демонстрационных посевах совместный рост аэробов и анаэробов.

6. Все демонстрационные посева зарисуйте в альбом.

7. Приготовьте взвесь почвы (1 г образца почвы поместите в колбу вместимостью 250 мл, добавьте 100 мл стерильной воды, встряхивайте на качалке в течение 15 мин, затем на 5 мин поставьте колбу на стол, чтобы крупные частицы почвы осели).

8. Полученную взвесь посевайте в среду Китта-Тароцци для обнаружения анаэробных бактерий.

9. Посевы инкубируйте в термостате при 37°C до появления роста.

Лабораторная работа № 16

Рост микроорганизмов в периодической культуре

Цель работы. Изучить фазы роста микроорганизмов в периодической культуре.

Материалы и оборудование. Среда Чапека с добавлением 5 % сусла в качалочных колбах вместимостью 100 мл, камеры Горяева, нефелометры, спиртовки, микроскоп, стерильные пипетки, чистые культуры дрожжей.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте взвесь культуры дрожжей в изотоническом растворе хлорида натрия, концентрация которой должна составлять около 5 млн клеток в 1 мл.

2. Стерильно внесите в подготовленную питательную среду полученную суспензию в таком количестве, чтобы в опытной колбе она составляла 0,5 или 1 % от общего объема (если в колбе 100 мл среды, то внесите 1 мл полученной взвеси дрожжей).

3. Инкубируйте культуру при 28°C на качалке в течение 6 – 8 ч. Каждые 2 ч при соблюдении стерильности отбирайте из колбы 1 мл суспензии и определяйте концентрацию дрожжевых клеток методом подсчета в камере Горяева или нефелометрически. Отбор проб прекращайте при снижении или отсутствии прироста биомассы в двух последовательных пробах.

4. Полученные данные (концентрации бактерий в суспензии) прологарифмируйте и постройте кривую роста популяции дрожжей. Вычислите константу скорости роста K и время генерации g по формулам:

$$K = \frac{\lg N - \lg N_0}{t \lg 2},$$

где N_0 – начальная концентрация клеток;

N – конечная концентрация клеток;

t – время культивирования.

$$g = \frac{1}{K},$$

где g – время генерации, то есть время, требующееся для одного цикла деления;

K – константа скорости роста или число клеточных делений за 1 ч.

5. Определите продолжительность каждой фазы роста.

Контрольные вопросы

1. Основные компоненты питательных сред для культивирования микроорганизмов.
2. Натуральные питательные среды. Для чего их используют?
3. Синтетические и полусинтетические питательные среды. Для чего их используют?
4. Дифференциально-диагностические среды. Для чего их применяют?
5. Как различаются питательные среды по физическому состоянию? Какие вещества используют для уплотнения сред?
6. Активная кислотность среды.
7. Влияние аэрации на процесс культивирования микроорганизмов.
8. Культивирование аэробных микроорганизмов.
9. Культивирование анаэробных микроорганизмов.
10. Влияние температурного режима на процесс культивирования микроорганизмов.
11. Периодическое и непрерывное культивирование.

IV. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методы определения количества микроорганизмов могут быть прямыми (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание на весах) или косвенными, посредством которых определяют число колоний микроорганизмов, выросших после посева суспензии клеток на питательную среду, рассеяние или поглощение суспензией клеток света, содержание в ней белка и др. Выбор метода зависит от целей исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов.

1. Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом

Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема. Следует помнить, что подсчитывают все клетки, как живые, так и мертвые.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева – Тома, хотя можно применять и другие счетные камеры. При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Эти кольца указывают на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3 – 5 мин после заполнения камеры, чтобы клет-

ки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости. Подвижные клетки перед заполнением камеры убивают нагреванием или суспендированием в 0,5%-ном водном растворе формалина.

Число клеток подсчитывают с объективом 8× или 40×. С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его фокусное расстояние меньше толщины стекла камеры. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600. Подсчет клеток повторяют 3 – 4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле

$$M = \frac{A \cdot 10^3}{hS} n,$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии;

A – среднее число клеток в 1 квадрате сетки;

h – высота камеры, мм; .

S – площадь 1 квадрата сетки, мм²;

10^3 – коэффициент перевода кубических сантиметров в кубические миллиметры;

n – разведение исследуемой суспензии.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Брида). Преимущество метода заключается в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время. Для этого хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечен прямоугольник площадью 4 или 6 см². Затем на стекло из микропипетки наносят точно измеренный объем исследуемой суспензии (0,01, 0,02 или 0,03 мл) и каплю 0,03 – 0,1%-ного водного раствора агара. Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют 10 – 20 мин 96%-ным спиртом и окрашивают 1 – 2 мин фуксинном Циля или любым другим красителем. Краситель сливают, препарат

промывают, последовательно погружая стекло в 4 – 5 стаканов с водой (промывать препарат под струёй водопроводной воды не следует), и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

Количество клеток подсчитывают с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать в 50 – 100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее 600. Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исследуемого субстрата, вычисляют по формуле

$$M = \frac{AS}{sV}n,$$

где M – количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата;

A – среднее число клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);

s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мкм²;

V – объем нанесенной на стекло суспензии, мл;

S – площадь приготовленного мазка, мкм²;

n – разведение исследуемого субстрата.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Этот метод применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других исследованиях. Фильтрация пробы определенного объема (от нескольких миллилитров до десятков литров) позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

2. Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха)

В основе метода лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного учета микроорганизмов, проведенного методом Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных единицах – так называемых колониеобразующих единицах (КОЕ).

Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Посев. Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают расплавленную, чаще всего агаризованную, питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15 – 20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушивать для удаления конденсационной воды.

После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и равномерно распределяют по поверхности среды.

При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило, 0,1; 0,5 или 1,0 мл) исходной суспензии или разведения вносят в расплавленную и остуженную до 48 – 50 °С агаризованную среду, тщательно перемешивают и затем немедленно выливают в чашку Петри. Среде дают застыть.

Подсчет выросших колоний. Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 2 – 15 сут инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Результаты учитывают на тех чашках Петри, на которых вырастает от 30 – 50 до 100 – 150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле

$$M = \frac{a10^n}{V},$$

где M – количество клеток в 1 мл;

a – среднее число колоний на чашке Петри;

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

10^n – коэффициент разведения.

Необходимо помнить, что статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке.

3. Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом

В основе метода лежит измерение уменьшения количества света при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно и пропорционально концентрации клеток и обусловлено преимущественно рассеянием света клетками. Величина этого показателя зависит от многих факторов (формы и размеров клеток, оптических свойств культуральной среды, длины волны падающего света и т.д.). Поэтому нефелометрический метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клеток, образованием мицелия, пленок или других скоплений. Питательная среда, в которой предполагается определять число клеток, должна быть оптически прозрачной. Изменение интенсивности света при прохождении через суспензию клеток измеряют с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра, выбирая длину волны (обычно в интервале 540 – 650 нм), при которой поглощение света данной суспензией клеток является минимальным.

4. Стандарты мутности и их применение

В ряде случаев количество клеток в суспензии бывает достаточно определить визуально путем сравнения со стандартом мутности. Стандарты мутности, выпускаемые государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, представляют собой взвесь частиц стекла пирекс в дистиллированной воде. За единицу стандарта мутности общего назначения условно принята мутность суспензии в физиологическом растворе бактерий - возбудителей тифа с концентрацией клеток 100 млн/мл. Стандарт мутности включает 4 эталона на 10, 11, 9 и 5 единиц, что соответствует содержанию $1 \cdot 10^9$; $1,1 \cdot 10^9$; $0,9 \cdot 10^9$ и $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл взвеси. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают их в отраженном и проходящем свете на фоне белого листа бумаги, в центре которого нанесено несколько черных линий.

Лабораторная работа № 17

Подсчет клеток дрожжей в счетной камере Горяева

Цель работы. Освоить метод подсчета микробных клеток в камере Горяева.

Материалы и оборудование. Микроскоп, счетные камеры Горяева, бактериологические петли, спиртовка, стерильная дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, стерильные пипетки вместимостью 1 – 2 мл.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте последовательные 10-кратные разведения исходной суспензии дрожжей: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (к 4,5 мл дистиллированной воды добавьте 0,5 мл суспензии дрожжей).

2. При увеличении $20\times$ или $40\times$ проведите подсчет клеток дрожжей в камере Горяева под микроскопом.

3. Результаты работы оформите в виде табл. 3.

Таблица 3

Учет количества клеток дрожжей в камере Горяева

| Разведение | Повторность | Количество клеток дрожжей в большом квадрате камеры Горяева | | | | | Общее число клеток в малых квадратах | Среднее число клеток | Количество клеток в исходном образце |
|------------|-------------|---|---|---|---|---|--------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 10^{-1} | | | | | | | | | |
| 10^{-2} | | | | | | | | | |
| 10^{-3} | | | | | | | | | |

Лабораторная работа № 18

Определение концентрации бактериальной суспензии высевом на плотные питательные среды

Цель работы. Освоить метод количественного учета микроорганизмов высевом на плотные питательные среды (метод Коха).

Материалы и оборудование. Бактериологические петли, спиртовка, стерильная дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, стерильные пипетки на 1 – 2 мл, МПА в чашках Петри, термостат с температурой 37°C .

Ход выполнения работы

1. Приготовьте последовательные 10-кратные разведения исходной суспензии дрожжей: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (к 4,5 мл дистиллированной воды добавьте 0,5 мл суспензии дрожжей).

2. Полученные разведения суспензии микроорганизмов тщательно перемешайте (встряхните) и высейте на поверхность агара в чашке Петри (в объеме 0,1 или 0,2 мл). Посев производите, начиная с наибольшего разведения (10^{-5}).

3. Равномерно распределите на поверхности агара высеянную суспензию, медленно вращая чашки Петри, и оставьте их при комнатной температуре на 30 мин для адсорбции микробов на поверхности агара.

4. Засеянные чашки Петри поместите в термостат с температурой 37°C и инкубируйте 24 – 48 ч (в зависимости от вида микроорганизмов). После этого произведите учет выросших колоний. Учитывать необходимо те чашки, на которых число колоний находится в диапазоне от 10 до 150 и общее число подсчитанных колоний при высеве из данного разведения должно быть не менее 300. При соблюдении этих условий учет результатов будет правильным.

5. Результаты работы оформите в виде табл. 4.

Таблица 4

Определение концентрации бактериальной суспензии

| Разведение | Количество колоний, выросших на чашке Петри | Среднее значение <i>a</i> | Количество микроорганизмов в 1мл исследуемой суспензии <i>M</i> |
|------------|---|------------------------------|--|
| 10-3 | | | |
| 10-4 | | | |
| 10-5 | | | |

Лабораторная работа № 19

Определение концентрации бактериальной суспензии с использованием бактериального стандарта мутности

Цель работы. Освоить метод определения концентрации микроорганизмов по бактериальному стандарту мутности.

Материалы и оборудование. Бактериальные стандарты мутности на 5 и 10 единиц, спиртовка, стерильная дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, стерильные пипетки вместимостью 1 – 2 мл, стерильные пробирки.

Ход выполнения работы

1. Ознакомьтесь с правилами пользования бактериальным стандартом мутности.
2. Стерильной пипеткой отберите 1 мл исходной суспензии дрожжей в стерильный флакон или мерную колбу вместимостью 100 мл или более.
3. В соответствии с правилами пользования бактериальным стандартом мутности определите концентрацию суспензии.
4. Запишите в тетрадь последовательность этапов определения концентрации и результат, который Вы получили.

Лабораторная работа № 20

**Количественный учет клеток дрожжей
на фиксированных препаратах**

Цель работы. Освоить метод определения концентрации микроорганизмов на фиксированных препаратах.

Материалы и оборудование. Предметные стекла, микроскоп, миллиметровая бумага, стерильный водный раствор агар-агара, бактериологические петли, 96%-ный спирт, фуксин или метиленовая синь, микропипетки, спиртовка, чистые культуры дрожжей, стерильные пипетки на 1 – 2 мл, стерильные пробирки.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте фиксированный препарат дрожжей (0,2 или 0,3 мл исследуемой суспензии нанесите микропипеткой на хорошо обезжиренное сухое предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу с очерченной площадью в 4 или 6 см², добавьте каплю стерильного 0,03%-ного водного раствора агар-агара, быстро перемешайте стерильной бактериологической петлей и равномерно распределите на площади отмеченной на бумаге, высушите мазок на воздухе, зафиксируйте 96%-ным спиртом в течение 20 – 30 мин).

2. Окрасьте полученный препарат основным фуксином или метиленовым синим в течение 2 мин и промойте его, погружая в воду и меняя воду до тех пор, пока после очередного погружения вода не останется бесцветной. Высушите препарат на воздухе.

3. Клетки подсчитывайте с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки (не менее 10 полей зрения), передвигая препарат по диагонали.

4. Рассчитайте среднее количество клеток в квадрате сетки (поле зрения).

5. Результаты работы оформите с виде табл. 5.

Таблица 5

Количественный учет клеток дрожжей на фиксированных препаратах

| Разведение | Количество клеток в квадрате сетки (поле зрения) | Число клеток | | Количество клеток в исходном образце |
|------------|--|--------------|---------|--------------------------------------|
| | | Общее | Среднее | |
| 0 | | | | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |

Контрольные вопросы

1. Какие методы подсчета микробных клеток Вы знаете и каковы критерии выбора метода?

2. Подсчет клеток в счетных камерах.

3. Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках.

4. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на питательные среды.

5. Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом.

6. Стандарты мутности и их применение.

V. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Характеристика культуральных и физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание их способности расти на разных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в состав этих сред.

1. Рост на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. При их описании учитывают следующие признаки:

- форму колонии – округлая, амебовидная, неправильная, ризоидная и т. д.;
- размер (диаметр) колонии, измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;
- поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- профиль колонии – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный;
- блеск и прозрачность – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;
- цвет колонии – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат.

2. Рост в жидких питательных средах

Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают степень помутнения – слабая, умеренная или сильная, особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, а при образовании осадка указывают, скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный. Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа.

Крахмал-йодная реакция на нитриты основана на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, присутствие которого обнаруживают с помощью крахмала. Для проведения реакции к капле культуральной жидкости добавляют каплю раствора, содержащего $ZnCl_2$, KI и крахмал, и каплю раствора HCl. При наличии в среде нитритов появляется синее окрашивание.

Протеолитическая активность определяется наличием ферментов (протеазы), катализирующих расщепление белков на поли- и олигопептиды. Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и другими микроорганизмами. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин или другие белки.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотическим веществам. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам удобно определять с помощью выпускаемых промышленностью бумажных дисков, пропитанных определенными антибиотиками. Концентрация антибиотиков в дисках подобрана с таким расчетом, чтобы диаметры задержки роста стандартных тест-организмов были 28 – 32 мм. Если исследуемые микроорганизмы чувствительны к данным антибиотикам, то вокруг дисков образуются зоны отсутствия роста. Диаметр зоны измеряют миллиметровой линейкой. Зона более 30 мм свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизма к антибиотику, а менее 12 мм – о слабой чувствительности.

Определение биохимических свойств *Bacillus subtilis*

Цель работы. Освоить методики проведения биохимических тестов для определения ферментативных свойств и идентификации бактерий.

Материалы и оборудование. Чистая культура *Bacillus subtilis* в чашках Петри с МПА, бактериологические петли, спиртовки, стерильные пробирки, предметные стекла, перекись водорода, среды с моно-, ди-, полисахаридами и спиртами, содержащие индикаторы; пробирки с МПБ; пробирки с 2 – 3%-ной пептонной водой; растворы цистина и цистеина, лакмусовая бумага, пробирки с мясо-пептонной желатиной, системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации энтеробактерий, производства Нижегородского предприятия бактериальных препаратов; стерильный физиологический раствор, термостат с температурой 37 °С.

Ход выполнения работы

1. Ознакомьтесь с инструкцией, прилагаемой к системе индикаторной бумажной (СИБ), для идентификации энтеробактерий и выберите с помощью преподавателя необходимый Вам набор тестов из этой системы.

2. Разлейте стерильный физиологический раствор в стерильные пробирки по 0,3 мл (по две пробирки на один тест: одна контрольная, инкубируется без бактерий, а вторая – опытная), внесите в ряд опытных пробирок одинаковое количество (одна петля агаровой культуры или 0,1 мл бульонной культуры) исследуемой культуры бактерий.

3. В соответствии с инструкцией внесите в пробирки бумажные диски тестов и инкубируйте пробирки при температуре 37 °С в соответствии с инструкцией.

4. Засейте чистую культуру исследуемых бактерий бактериологической петлей на среды с моно-, ди-, полисахаридами и спиртами, предоставленные преподавателем, и инкубируйте их в течение 18 –24 ч при температуре 37 °С.

5. Для определения каталазной активности на предметное стекло нанесите каплю 3%-ного раствора перекиси водорода, внесите в нее петлю исследуемой агаровой или бульонной культуры бактерий и тщательно перемешайте. При положительной реакции (наличии каталазы) перекись водорода будет разлагаться с образованием воды и выделением кислорода в виде пузырьков.

6. Через 24 ч внимательно просмотрите все контрольные и опытные пробирки с тестами СИБ и посевы на среды с сахарами и спиртами. Результаты определения ферментативных свойств *Bacillus subtilis* оформите в виде табл. 6

Таблица 6

Ферментативные свойства Bacillus subtilis

| Сахаролитические свойства | | | | Протеолитические свойства | | | Наличие каталазы |
|---------------------------|---------|--------|--------|---------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Глюкоза | Лактоза | Маннит | Сорбит | Индол | H ₂ S | NH ₃ | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

Лабораторная работа № 22

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Цель работы. Освоить постановку теста определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Материалы и оборудование. Чистая культура бактерий в пробирках или чашках Петри с МПА, бактериологические петли, спиртовки, стерильные пробирки, предметные стекла, чашки Петри с МПА, бумажные диски, пропитанные антибиотиками, стерильный физиологический раствор, термостат с температурой 37 °С.

Ход выполнения работы

1. Смойте стерильным физраствором агаровую культуру. Для этого в пробирку или чашку Петри стерильно внесите 2 – 3 мл физраствора. Бактериологической петлей осторожно снимите культуру с поверхности агара и тщательно размешайте в физрастворе.

2. Из полученной взвеси клеток приготовьте бактериальную суспензию с концентрацией 500 млн микробных клеток по стандарту мутности и внесите в чашку Петри с подсушенным стерильным МПА. Равномерно распределите суспензию на поверхности агара и оставьте при комнатной температуре на 30 мин для адсорбции клеток.

3. Через 30 мин стерильной пипеткой отберите излишек суспензии и поместите на поверхность засеянной бактериями среды на равном расстоя-

нии (2,5 – 3,0 см) друг от друга и на расстоянии 1,5 – 2,0 см от края чашки бумажные диски, пропитанные антибиотиками.

4. Инкубируйте посе́вы при температуре 37 °С в течение 24 ч.

5. Через 24 ч измерьте диаметр зоны задержки роста культуры вокруг каждого диска с антибиотиком и определите степень чувствительности культуры по следующим критериям:

а) диаметр зоны задержки роста более 25 мм – культура высокочувствительная,

б) от 15 до 25 – чувствительная;

в) от 10 до 14 – малочувствительная;

г) менее 10 мм и полное отсутствие – устойчивая.

6. Результаты оформите в виде табл. 7.

Таблица 7

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

| Анти-биотик | Наименование или номер исследуемой культуры | | | |
|-------------|---|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | 1 | | 2 | |
| | Диаметр зоны задержки роста, мм | Степень чувствительности | Диаметр зоны задержки роста, мм | Степень чувствительности |
| | | | | |
| | | | | |

Контрольные вопросы

1. Культуральные свойства. Рост на плотных питательных средах.
2. Культуральные свойства. Рост в жидких питательных средах.
3. Физиолого-биохимические свойства. Отношение к молекулярному кислороду и рост в анаэробных условиях.
4. Физиолого-биохимические свойства. Определение способности к аэробному дыханию.
5. Физиолого-биохимические свойства. Реакция на нитраты с дифениламином. Крахмал-йодная реакция на нитриты.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотическим веществам.

VI. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Идентификация микроорганизмов базируется на изучении морфологических, цитологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств. В работе по идентификации микроорганизмов необходимо соблюдать следующие правила: использовать чистые культуры, применять при изучении стандартные методы, использовать для инокуляции диагностических сред культуры, находящиеся в активном физиологическом состоянии.

Лабораторная работа № 23

Идентификация микроорганизмов по определителю бактерий Берджи

Цель работы. Освоить работу с определителем бактерий Берджи.

Материалы и оборудование. Определитель бактерий Берджи, данные определения ферментативных свойств зашифрованных преподавателем культур бактерий, предметные стекла с готовыми препаратами зашифрованных культур бактерий, микроскоп, иммерсионное масло.

Ход выполнения работы

1. Внимательно промикроскопируйте с иммерсионной системой готовый препарат неизвестной Вам культуры бактерий, охарактеризуйте морфологию клеток бактерий, их размер и окраску по Граму.
2. Ознакомьтесь с данными ферментативных свойств идентифицируемой культуры.
3. По определителю бактерий Берджи постарайтесь определить семейство, род и вид данных микроорганизмов.
4. Подробно запишите характеристику идентифицируемой культуры бактерий в табл. 8.

Таблица 8

Идентификация микроорганизмов по определителю бактерий Берджи

| Свойство (признак) | Характеристика |
|-----------------------------------|----------------|
| Морфология колонии: | |
| форма | |
| размер, мм | |
| цвет | |
| прозрачность | |
| край | |
| блеск | |
| поверхность | |
| профиль | |
| Морфология клеток: | |
| расположение клеток | |
| размер, мкм | |
| подвижность | |
| наличие эндоспор | |
| окраска по Граму | |
| Среда обитания | |
| Физиолого-биохимические свойства: | |
| тест на каталазу | |
| тест на оксидазу | |
| отношение к O ₂ | |
| отношение к температуре | |
| окисление и ферментация глюкозы | |
| рост на среде с крахмалом | |
| Ферментация сахаров и спиртов | |
| Протеолитические свойства | |

5. Результаты идентификации запишите в табл. 9.

Таблица 9

| Номер культуры | Идентификация | | |
|----------------|---------------|-----|-----|
| | Семейство | Род | Вид |
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| | | | |

VI. МЕТОДЫ АНАЛИЗА МИКРОФЛОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Микроорганизмы широко распространены в природе и обнаруживаются во всех природных средах. Обнаружение и количественный учет микроорганизмов в объектах окружающей среды необходимы при санитарно-гигиенических и экологических исследованиях для моделирования природных систем и разработки основ управления природными процессами.

Лабораторная работа № 24

Качественно-количественный учет микрофлоры почвы

Цель работы. Освоить метод посева проб почвы на питательные среды, метод определения количества микроорганизмов в почве и выделения чистых культур бактерий из проб почвы.

Материалы и оборудование. Весы, ступка, резиновые перчатки, колба со стерильной дистиллированной водой, пипетки на 10 мл и 1 мл, стерильные пробирки, колба вместимостью 250 мл, чашки Петри с МПА, средой Эшби, средой Чапека.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте суспензию почвы. Для этого отвесьте 10 г почвы и перенесите навеску в стерильную ступку, добавьте 2 – 3 мл стерильной воды и разотрите до пастообразного состояния.

2. Полученную пробу почвы (10 г) перенесите в стерильную колбу, содержащую 90 мл стерильной воды, размешайте в течение 5 мин и дайте отстояться 30 мин. Это первое разведение исследуемой пробы почвы.

3. Приготовьте ряд последующих 10-кратных разведений этой пробы в пробирках в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в пробе. Для приготовления каждого последующего разведения используйте новую пипетку.

4. Полученные разведения в объеме 0,1 мл посейте (на каждое разведение по 2 – 3 чашки):

- а) на МПА для определения общего числа бактерий;
- б) на среду Чапека для учета и выделения актиномицетов;
- в) на среду Эшби для учета и выделения азотобактера.

5. Равномерно распределите каплю инокулята на поверхности агара, покачивая чашку, и оставьте на 30 мин для адсорбции при комнатной температуре.

6. Засеянные чашки Петри через 30 минут переверните вверх дном и поместите в термостат при температуре 28 – 37 °С для выращивания мезофильной микрофлоры. Количество бактерий на МПА учитывайте через 1 – 5 сут, актиномицетов и азотобактера – через 5 – 7 сут.

7. Учитывайте количество колоний следующим образом: дно чашки Петри маркером разделите на равные сектора, учтенные колонии отмечайте точками на стекле. Подсчитайте среднее число колоний на чашке и далее пересчитайте количество микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы по формуле

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

- 8. Результаты работы внесите в табл. 10.

Таблица 10

Качественно-количественный учет микрофлоры почвы

| Номер пробы | Общее число бактерий | Количество в 1 г почвы | |
|-------------|----------------------|------------------------|--------------|
| | | актиномицетов | азотобактера |
| 1 | | | |
| 2 | | | |

Лабораторная работа № 25

Количественный учет бактерий в пробах воды. Определение титра и индекса кишечной палочки

Цель работы. Освоить методы отбора проб воды, их посева и определения бактериальной загрязненности воды.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, стерильные чашки Петри с МПА и средой Эндо, исследуемые пробы воды, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, красители для окраски по Граму, установка вакуумной фильтрации «Владисарт», мембранные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм, системы индикаторные бумажные (СИБ), для идентификации энтеробактерий, производства Нижегородского предприятия бактериальных препаратов, стерильный физиологический раствор; термостат с температурой 37 °С.

Ход выполнения работы

1. Отберите пробы воды в стерильные флаконы или колбы в объеме 50 или 100 мл непосредственно перед началом занятия: а) пробу водопроводной воды; б) пробу из открытого водоема (ручей, ключ, пруд). До начала занятия (посева) пробы можно хранить не более 3 ч при температуре не выше 4 °С.

2. Приготовьте ряд последующих 10-кратных разведений отобранных проб в пробирках, в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов в пробе. Для приготовления каждого последующего разведения используйте новую пипетку.

3. Полученные разведения в объеме 0,1 мл посейте (на каждое разведение по 2 – 3 чашки):

а) на МПА для определения общего числа бактерий;

б) на среду Эндо для учета БГКП (бактерии группы кишечной палочки или энтеробактерии).

4. В чашки Петри с МПА и средой Эндо внесите по 0,1 мл последнего и предпоследнего разведений, равномерно распределите каплю инокулята на поверхности агара, покачивая чашку, и оставьте на 30 мин для адсорбции при комнатной температуре.

5. Засеянные чашки Петри через 30 мин переверните вверх дном и поместите в термостат при температуре 28 – 37 °С для выращивания мезофильной микрофлоры. Количество бактерий учитывайте через 1 – 2 сут.

6. Водопроводную воду исследуйте также методом мембранных фильтров, которые простерилизуйте кипячением в течение 30 мин. Фильтровальную установку «Владисарт» подготовьте к работе вместе с преподавателем.

7. Профильтруйте пробу водопроводной воды в объеме 100 мл. Стерильным пинцетом фильтр аккуратно перенесите в чашку Петри с МПА (для определения общего числа бактерий) и средой Эндо и поместите в термостат с температурой 37 °С.

8. Учитывайте количество колоний следующим образом: дно чашки Петри маркером разделите на равные секторы, учтенные колонии отмечайте точками на стекле. Для определения титра подсчитайте среднее число колоний на чашке и умножьте на разведение.

9. Для подтверждения принадлежности к БГКП из колоний, выросших на среде Эндо, приготовьте фиксированные мазки, окрасьте их по Граму, промикроскопируйте. Грамотрицательные бактерии протестируйте по биохимическим свойствам с системой индикаторной бумажной (СИБ) для идентификации энтеробактерий.

10. Подсчитайте количество колоний кишечной палочки на 1 мл воды по формуле (см. с. 47).

11. Результаты запишите в табл. 11.

Таблица 11

Количественный учет бактерий в пробах воды

| Номер пробы | Общее число бактерий в 1 мл воды | Коли-титр |
|-------------|----------------------------------|-----------|
| 1 | | |
| | | |

Лабораторная работа № 26

Определение бактериальной обсемененности воздуха

Цель работы. Освоить определение бактериальной обсемененности воздуха методами оседания и фильтрования.

Материалы и оборудование. Стерильные чашки Петри с МПА, установка вакуумной фильтрации «Владисарт», мембранные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм; термостат с температурой 37 °С.

Ход выполнения работы

1. Чашки Петри с МПА поставьте в различных помещениях, указанных преподавателем, откройте крышки и экспонируйте 5 – 15 мин, в зависимости от предполагаемого бактериального загрязнения.

2. Через указанное время чашку закройте и инкубируйте в термостате с температурой 37 °С в течение суток.

3. Подсчитайте среднее количество колоний, выросшее на чашке и рассчитайте среднее микробное число по формуле

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 1 \cdot 5}{B \cdot 10 \cdot t},$$

где X – количество микробов в 1 м³ воздуха;

A – количество колоний в чашке;

B – площадь чашки Петри (при диаметре 8 см – 50 см², 9 см – 63 см²);

t – время экспозиции в опыте, мин;

5 – время экспозиции, мин;

10 – объем воздуха, из которого происходит оседание микробов за 5 мин, л;

100 – площадь, на которую происходит оседание, см²;

1 000 – объем воздуха, л.

4. Соберите фильтрационную установку «Владисарт», пропускайте через неё воздух в течение 5 мин, затем стерильным пинцетом аккуратно перенесите фильтр на чашку Петри со стерильным МПА.

5. Инкубируйте чашку с фильтром в течение суток при температуре 37 °С и подсчитайте количество колоний, выросших на фильтре в соответствии с инструкцией к прибору.

6. Полученные результаты запишите в табл. 12.

Таблица 12

Определение бактериальной обменности воздуха

| Номер пробы | Общее микробное число в воздухе | |
|-------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | по методу оседания | по методу мембранных фильтров |
| | | |
| | | |

VII. УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

Микроорганизмы активно участвуют в процессах разложения органических азотсодержащих веществ, в превращении углеводов в органические кислоты и другие продукты, в восстановлении неорганических соединений серы до сероводорода и окисления соединений железа, способствуя круговороту веществ.

Лабораторная работа № 27

Получение накопительной культуры денитрифицирующих бактерий

Цель работы. Освоить метод получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий, методы определения нитратов, нитритов и аммиака в среде культивирования.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, почва, бактериологические петли, спиртовка, пинцет, скальпель, компоненты для среды Гильтая или готовая среда в пробирках, парафиновое или вазелиновое масло, красная лакмусовая бумага, 1%-ный водный раствор фуксина или генцианвиолета, дифениламин, 20%-ный раствор серной кислоты, 10%-ный раствор хлорида бария, цинк-йод-крахмал, реактив Несслера.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте среду Гильтая следующего состава, г/л: лимоннокислый калий или натрий (трехзамещенный) – 5,0; KNO_3 – 2,0, KH_2PO_4 – 2,0; MgSO_4 – 2,0; CaCO_3 – 0,2; аспарагин – 1,0; FeCl_3 – следы; вода водопроводная. pH среды доведите до 6,8 – 7,2 10%-ными растворами NaOH и HCl. Среду разлейте в пробирки высоким слоем и стерилизуйте в автоклаве при 0,5 атм 20 мин.

2. Поместите в пробирки со средой комочки почвы, на поверхность среды аккуратно по стенке пробирки налейте 0,2 мл вазелинового масла для создания анаэробных условий и инкубируйте в термостате при 30 – 37 °C в течение 1 – 2 недель. Одну пробирку оставьте незасеянной в качестве контроля.

3. Через 7 – 14 сут просмотрите посевы, отметьте помутнение среды, выделение газов, изменение цвета (сине-зеленый цвет является следствием размножения бактерий *Pseudomonas aeruginosa*).

4. Проведите тесты на наличие аммиака и отсутствие нитратов и нитритов. Аммиак обнаруживают по запаху и посинению красной лакмусовой бумаги или с помощью реактива Несслера. Нитраты и нитриты обнаруживают по реакции с реактивом цинк-йод-крахмал: к трем каплям цинк-йод-крахмала добавляют одну каплю 20%-ного раствора серной кислоты и одну каплю исследуемой среды. Синий цвет свидетельствует о наличии азотистой кислоты.

5. Приготовьте фиксированные мазки полученных культур, покрасьте и микроскопируйте. Зарисуйте морфологию клеток денитрифицирующих бактерий.

Лабораторная работа № 28

Накопительные культуры микроорганизмов, разрушающих целлюлозу

Цель работы. Освоить метод получения накопительной культуры микроорганизмов, разрушающих целлюлозу.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, стерильная фильтровальная бумага, стерильные стеклянные палочки, бактериологические петли, спиртовка, пинцет, скальпель, стерильные чашки Петри, компоненты для среды Гетчинсона или готовая среда, почва.

Ход выполнения работы

1. Приготовьте среду Гетчинсона следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 0,1; NaCl – 0,1; CaCl_2 – 0,1; TeCl_3 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaNO_3 – 2,5; агар-агар – 20 г (2 %).

2. Среду разлейте в чашки Петри и на поверхность положите стерильную фильтровальную бумагу, вырезанную по размеру диаметра чашки.

3. Комочки почвы разложите на поверхность фильтра стерильной стеклянной палочкой параллельными рядами на расстоянии 1 см друг от друга.

4. Поместите чашки в термостат при 30 – 37 °С и инкубируйте в течение 10 – 14 сут.

5. После инкубации просмотрите посевы, определите образование колоний целлюлозоразлагающих бактерий, вокруг них бумага становится прозрачной, ослизняется, видны желтые, зеленые, оранжевые и коричне-

вые пятна. Подсчитайте процент колоний целлюлозоразлагающих бактерий в вашей пробе почвы (общее количество комочков почвы – 100 %, целлюзообразующих бактерий – x %).

6. Приготовьте препарат «раздавленная капля» из зон разрушения клетчатки. Опишите и зарисуйте морфологию клеток целлюлозоразлагающих бактерий.

Лабораторная работа № 29

Накопительная культура сульфатредуцирующих бактерий

Цель работы. Освоить метод получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий.

Материалы и оборудование. Микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, столик для окрашивания препаратов, промывалка с водой, красители для окраски по Граму, стерильные пробирки, компоненты для среды Постгейта или готовая среда, резиновые пробки, парафин, пробы сточной воды или почвы (лучше болотной).

Ход выполнения работы

1. Приготовьте среду Постгейта следующего состава:

– раствор 1, г: KH_2PO_4 – 1,0; NH_4Cl – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; лактат Na (70%-ный раствор) – 3,5; дрожжевой экстракт – 1,0; pH = 7,4; дистиллированная вода – 980 мл;

– раствор 2, г: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дистиллированная вода – 10 мл;

– раствор 3, г: аскорбиновая кислота – 0,1; Na-тиогликолят – 0,1; дистиллированная вода – 10 мл, pH = 7,4.

Растворы простерилизуйте отдельно, затем слейте и расфасуйте по стерильным пробиркам до самого верха.

2. Внесите почву или пробу сточной воды, плотно закройте пробирки резиновыми пробками и залейте парафином.

3. Инкубируйте пробирки в течение 20 – 25 сут в термостате при 30 – 37 °С.

4. Просмотрите посеы после инкубации. Пробы считают положительными по сульфатредуцирующим бактериям, если в пробирках осадок после инкубации почернел.

5. Приготовьте фиксированный мазок, окрасьте, посмотрите под иммерсионным объективом.

6. Опишите характер роста в пробирках и зарисуйте морфологию клеток сульфатредуцирующих бактерий.

ПРОВЕРОЧНЫЕ ТЕСТЫ

1. Какую популяцию микроорганизмов называют чистой?
 - а) состоящую из микроорганизмов одинаковой морфологии;
 - б) состоящую из микроорганизмов одного вида;
 - в) состоящую из микроорганизмов с одинаковыми биохимическими свойствами;
 - г) состоящую из микроорганизмов с одинаковыми культуральными свойствами.

2. Какую популяцию микроорганизмов называют смешанной?
 - а) состоящую из микроорганизмов разной морфологии;
 - б) состоящую из микроорганизмов с разными биохимическими свойствами;
 - в) состоящую из микроорганизмов разных видов;
 - г) состоящую из микроорганизмов по-разному окрашивающихся по Граму.

3. Что такое инокуляция микроорганизмов?
 - а) внесение микроорганизмов в нестерильную среду;
 - б) внесение микроорганизмов в жидкую питательную среду;
 - в) внесение микроорганизмов в стерильную среду;
 - г) внесение микроорганизмов в плотную питательную среду.

4. Что такое стерилизация?
 - а) очищение;
 - б) обеспложивание;
 - в) обеззараживание;
 - г) дезинфекция.

5. Что означает термин «дезинфекция»?
 - а) очищение;
 - б) обеспложивание;
 - в) обеззараживание;
 - г) стерилизация.

6. Автоклавирование – это:
- а) стерилизация кипячением;
 - б) стерилизация паром;
 - в) стерилизация насыщенным паром под давлением;
 - г) стерилизация газообразными средствами.
7. Тиндализация – это:
- а) стерилизация кипячением;
 - б) дробная стерилизация текучим паром;
 - в) стерилизация насыщенным паром под давлением;
 - г) стерилизация газообразными средствами.
8. Питательные среды, содержащие в своем составе углеводы стерилизуют:
- а) кипячением;
 - б) тиндализацией;
 - в) автоклавированием;
 - г) пастеризацией.
9. Пастеризация – это:
- а) стерилизация кипячением;
 - б) дробная стерилизация текучим паром;
 - в) стерилизация насыщенным паром под давлением;
 - г) однократный прогрев при температуре ниже 100 °С.
10. Стерилизацию фильтрованием применяют:
- а) для питательных сред, которые содержат жиры;
 - б) питательных сред, которые содержат легко разрушающиеся компоненты;
 - в) питательных сред, которые содержат белки;
 - г) питательных сред, которые содержат неорганические соединения.
11. Все бактериальные клетки имеют основные структуры и дополнительные. Какая из перечисленных ниже структур является основной?
- а) капсула;
 - б) жгутики;
 - в) цитоплазма;
 - г) пили.

12. Все бактерии делятся на две группы по способности окрашиваться по Граму: грамположительные и грамотрицательные. В какой цвет окрашиваются грамотрицательные бактерии?

- а) розово-красный;
- б) зеленый;
- в) сине-фиолетовый;
- г) коричнево-желтый.

13. В составе клеточной стенки содержится определенное количество полисахаридов, липидов, белков и пептидогликана, количество которого различно у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Какое количество пептидогликана содержится в клеточной стенке грамположительных бактерий, %?

- а) 5 – 10;
- б) 10 – 20;
- в) 40 – 90;
- г) 10 – 30.

14. Бациллами называют бактерии, которые:

- а) не образуют спор;
- б) образуют споры;
- в) образуют споры и размер их не превышает диаметра клетки;
- г) образуют споры и размер их превышает диаметр клетки.

15. По форме бактерии бывают шаровидные, палочковидные, извитые и ветвящиеся. Бактерии, которые имеют извитую форму, называются:

- а) кокками;
- б) спирохетами;
- в) актиномицетами;
- г) палочками.

16. Жизнедеятельность бактерий, протекающая в присутствии свободного кислорода, называется:

- а) брожением;
- б) окислением;
- в) аэробизмом;
- г) восстановлением.

17. Рост периодической культуры бактерий, выращиваемой в жидкой питательной среде, подразделяют на несколько фаз или периодов. Период между посевом бактерий и началом размножения называется:

- а) фазой экспоненциального, или логарифмического, роста;
- б) фазой гибели;
- в) лаг-фазой;
- г) фазой стационарного роста.

18. Питательные среды, в состав которых входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах, называются:

- а) натуральными;
- б) дифференциально-диагностическими;
- в) полусинтетическими;
- г) синтетическими.

19. Питательные среды, которые дают возможность быстро отличить одни виды бактерий от других, называются:

- а) натуральными;
- б) дифференциально-диагностическими;
- в) полусинтетическими;
- г) синтетическими.

20. Микроорганизмы участвуют в минерализации органических соединений растительного и животного происхождения до неорганических. В круговороте углерода принимают участие:

- а) сальмонеллы;
- б) цианобактерии;
- в) кишечные палочки;
- г) актиномицеты.

21. В естественных условиях бактерии развиваются при определенных диапазонах температур. Бактерии называют мезофилами, если они растут при температуре, °С:

- а) от 10 до 47;
- б) от 40 и выше;
- в) от 37 до 45;
- г) от -50 до 10.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В микробиологических лабораториях учебных заведений не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами.
2. Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания растворами лизола или хлорамина, а также 70%-ными (по объему) растворами изопропилового или этилового спиртов.
3. Нельзя загромождать рабочее место посторонними предметами.
4. Все сосуды, содержащие реактивы и другие вещества, должны иметь этикетки или быть пронумерованы, чтобы их нельзя было перепутать.
5. Нельзя пробовать на вкус химические вещества и питательные среды.
6. Нельзя работать в лаборатории без спецодежды. В микробиологической лаборатории можно находиться только в белом халате.
7. По окончании работ в лаборатории дежурный и руководитель перед уходом обязаны проверить, закрыты ли все газовые и водяные вентили, потушены ли спиртовки, выключены ли электронагревательные приборы и вентиляция, убраны ли горючие вещества.
8. Работа под вакуумом должна производиться в очках, стеклянные сосуды должны быть защищены экранами или обернуты полотенцем.
9. Проводить операции с нагревом, при которых используются кислоты или щелочи, следует только в очках.
10. По окончании работы привести рабочее место в порядок.
11. Не оставлять в открытом состоянии реактивы, едкие щелочи и кислоты.
12. Сдать в мойку лабораторную посуду или вымыть её самому.
13. Нельзя находиться в небольших помещениях (боксах) при включенной бактерицидной лампе.
14. Не разрешается в лаборатории курить, хранить и употреблять еду, напитки, жевательную резинку.
15. К работе с автоклавом и другими сосудами под давлением допускаются только подготовленные лица!

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В практикуме мы рассмотрели только некоторые лабораторные работы по основным разделам общей микробиологии, которые позволяют студентам ознакомиться с общими положениями и освоить технику микроскопирования микроорганизмов, стерилизации, приготовления питательных сред, выделения чистых культур микроорганизмов, методы их культивирования и количественного учета.

Объем представленного издания не позволяет рассмотреть многие достаточно важные и современные методы исследования микроорганизмов. При дальнейшем изучении общей микробиологии студентам следует помнить, что существуют другие подходы и методы в изучении микроорганизмов, очень тонкие методики и сложные схемы идентификации, разнообразные системы анализа.

И в XX, и в XXI веке с каждым последующим годом общая микробиология, являясь фундаментальной наукой, все в большей степени служит основой для многих прикладных дисциплин, таких как биотехнология, медицина, ветеринария, сельскохозяйственные науки и т.д.

Библиографический список

1. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлигель. – М. : Мир, 1987. – 566 с.
2. Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : Academia, 2003. – 462 с. – ISBN 5-7695-1403-5.
3. Практикум по микробиологии / под ред. Н. С. Егорова. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 307 с.
4. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Т.1 : пер с англ. – М. : Мир, 1997. – 430 с. – ISBN 5-03-003110.
5. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. – М. : Медицина, 1978. – 392 с.
6. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб. : Спец. лит., 1998. – 582 с. – ISBN 5-8657-102-4.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследований / под ред. М.О. Биргера. – М. : Медицина, 1982. – 462 с.
8. Методы общей микробиологии. В 3 т. Т.1. : пер. с англ. / под ред. Ф. Герхардта. – М. : Мир, 1983. – 563 с.
9. Луста, К. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К. А. Луста, Б. А. Фихте. – Пущино, 1990. – 187 с.
10. Мейнелл, Д. Экспериментальная микробиология / Д. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М. : Мир, 1967. – 378 с.
11. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий : пер. с англ. – М. : Мир, 1999. – 792 с. – ISBN 5-03-003278-8.
12. Роуз, Э. Химическая микробиология / Э. Роуз. – М. : Мир, 1971. – 294 с.
13. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д. Г. Звягинцева. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 304 с. – ISBN 5-211-01675-0.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| Предисловие..... | 3 |
| I. ОБЩАЯ ЧАСТЬ..... | 4 |
| 1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней..... | 4 |
| 2. Методы стерилизации питательных сред и посуды..... | 6 |
| Лабораторная работа № 1. Оборудование микробиологической лаборатории и подготовка посуды к стерилизации..... | 11 |
| 3. Методы приготовления препаратов для микроскопии..... | 11 |
| Лабораторная работа № 2. Устройство биологического микроскопа, типы микроскопии и правила пользования иммерсионным объективом микроскопа..... | 16 |
| Лабораторная работа № 3. Приготовление прижизненных препаратов клеток микроорганизмов..... | 16 |
| Лабораторная работа № 4. Препараты фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов..... | 17 |
| Контрольные вопросы..... | 17 |
| II. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ И КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСРЕДСТВОМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ..... | 19 |
| 1. Морфология бактерий..... | 19 |
| 2. Морфология грибов..... | 20 |
| 3. Морфология простейших..... | 21 |
| Лабораторная работа № 5. Морфология бактерий..... | 21 |
| Лабораторная работа № 6. Морфология спирохет..... | 22 |
| Лабораторная работа № 7. Морфология споровых микроорганизмов, микобактерий и актиномицетов..... | 23 |
| Лабораторная работа № 8. Морфология дрожжевых грибов..... | 23 |
| 4. Морфология клеточных структур..... | 24 |
| Лабораторная работа № 9. Окраска бактерий по Граму..... | 28 |
| Лабораторная работа № 10. Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов..... | 29 |
| Лабораторная работа № 11. Окраска капсул бактерий по методу Гинса..... | 30 |
| Лабораторная работа № 12. Окраска спор бактерий..... | 30 |
| Контрольные вопросы..... | 31 |

| | |
|--|----|
| III. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. | |
| ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ..... | 32 |
| 1. Основные компоненты питательных сред..... | 32 |
| 2. Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды..... | 34 |
| 3. Условия культивирования микроорганизмов..... | 35 |
| 4. Культивирование аэробных микроорганизмов..... | 36 |
| 5. Культивирование анаэробных микроорганизмов..... | 37 |
| Лабораторная работа № 13. Культивирование бактерий на жидких и плотных питательных средах..... | 38 |
| Лабораторная работа № 14. Получение накопительной и чистой культур бактерий..... | 39 |
| Лабораторная работа № 15. Культивирование анаэробных культур бактерий..... | 40 |
| Лабораторная работа № 16. Рост микроорганизмов в периодической культуре..... | 41 |
| Контрольные вопросы..... | 42 |
| IV. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ..... | 43 |
| 1. Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом..... | 43 |
| 2. Определение количества клеток высеvom на плотные питательные среды (чашечный метод Коха)..... | 45 |
| 3. Определение количества клеток биомассы нефело- метрическим методом..... | 47 |
| 4. Стандарты мутности и их применение..... | 47 |
| Лабораторная работа № 17. Подсчет клеток дрожжей в счетной камере Горяева | 48 |
| Лабораторная работа № 18. Определение концентрации бакте- риальной суспензии высеvom на плотные питательные среды..... | 48 |
| Лабораторная работа № 19. Определение концентрации бактериальной суспензии с использованием бактериального стандарта мутности..... | 49 |
| Лабораторная работа № 20. Количественный учет клеток дрожжей на фиксированных препаратах..... | 50 |
| Контрольные вопросы..... | 51 |
| V. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ..... | 52 |
| 1. Рост на плотных питательных средах..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 2. Рост в жидких питательных средах..... | 53 |
| Лабораторная работа № 21. Определение биохимических свойств <i>Bacillus subtilis</i> | 54 |
| Лабораторная работа № 22. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам..... | 55 |
| Контрольные вопросы..... | 56 |
| VI. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. | 57 |
| Лабораторная работа № 23. Идентификация микроорганизмов по определителю бактерий Берджи..... | 57 |
| VII. МЕТОДЫ АНАЛИЗА МИКРОФЛОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ | 59 |
| Лабораторная работа № 24. Качественно-количественный учет микрофлоры почвы..... | 59 |
| Лабораторная работа № 25. Количественный учет бактерий в пробах воды. Определение титра и индекса кишечной палочки..... | 60 |
| Лабораторная работа № 26. Определение бактериальной обсемененности воздуха..... | 62 |
| VIII. УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В КРУГОВОРОТЕ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ | 64 |
| Лабораторная работа № 27. Получение накопительной культуры денитрифицирующих бактерий..... | 64 |
| Лабораторная работа № 28. Накопительные культуры микроорганизмов, разрушающих целлюлозу | 65 |
| Лабораторная работа № 29. Накопительная культура сульфатредуцирующих бактерий..... | 66 |
| Проверочные тесты | 67 |
| Правила техники безопасности в микробиологической лаборатории | 71 |
| Заключение | 72 |
| Библиографический список | 73 |

Учебное издание

ПРУНТОВА Ольга Владиславовна
САХНО Ольга Николаевна

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Редактор Р.С. Кузина
Корректор Е.В. Афанасьева
Компьютерная верстка С.В. Павлухиной

ЛР № 020275. Подписано в печать 18.08.05.
Формат 60x84/16. Бумага для множит. техники. Гарнитура Таймс.
Печать на ризографе. Усл. печ. л. 4,42. Уч.-изд. л. 4,45. Тираж 100 экз.

Заказ

Издательство
Владимирского государственного университета.
600000, Владимир, ул. Горького, 87.