

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

В. В. Лысак Р. А. Желдакова
О. В. Фомина

МИКРОБИОЛОГИЯ

ПРАКТИКУМ

*Рекомендовано Учебно-методическим объединением
по естественнонаучному образованию в качестве пособия
для студентов учреждения высшего образования,
обучающихся по специальностям
1-31 01 01 «Биология (по направлениям)»,
1-31 01 02 «Биохимия», 1-33 01 01 «Биоэкология»*

МИНСК
БГУ
2015

УДК 579(075.8)(076.5)

ББК 28.4я73

Л88

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент *Н. А. Белясова*;

кандидат биологических наук *С. Л. Василенко*

Лысак, В. В.

Л88 Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.
ISBN 978-985-566-201-4.

В пособии приводятся рекомендации для выполнения лабораторных заданий по курсу «Микробиология», формы контроля управляемой самостоятельной работы студентов, а также программа курса «Микробиология».

Предназначено для студентов учреждения высшего образования, обучающихся по специальностям 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», 1-31 01 02 «Биохимия», 1-33 01 01 «Биоэкология».

УДК 579(075.8)(076.5)

ББК 28.4я73

© Лысак В. В.,
Желдакова Р. А.,
Фомина О. В., 2015

© БГУ, 2015

ISBN 978-985-566-201-4

ПРЕДИСЛОВИЕ

Бактерии являются особой группой организмов со специфической морфологией, разнообразными метаболическими свойствами и характерным способом размножения. Примерно с XIX в. они стали основным объектом экспериментальных исследований по ключевым направлениям клеточной биологии. Использование бактерий послужило существенным стимулом развития общебиологических исследований, и многие современные концепции биологии были сформулированы именно на их примере. Микробиология и бактериология связаны самым тесным образом и определяются развитием и совершенствованием методов изучения и использования клеток и их популяций (чистых культур или ассоциаций).

Данное пособие представляет собой краткое руководство по наиболее доступным, но важным и надежным методам исследования, применяемым в бактериологической практике. Оно содержит сведения о том, как необходимо работать на начальных этапах экспериментальных исследований, с какой целью нужно применять тот или иной методический подход. Приведенные практические методы являются классическими, проверены на практике и приняты во многих лабораториях. Они могут применяться в любой области, где приходится иметь дело с бактериями, в том числе для решения некоторых практических задач. Для более глубокого и полного изучения предмета следует воспользоваться основным и дополнительным списком приведенной литературы.

В книге рассмотрен широкий круг вопросов по выделению сапротрофных микроорганизмов из окружающей среды, изложены общие принципы работы с ними, методика изучения некоторых физиолого-биохимических свойств и особенностей метаболизма, основы генетических подходов к исследованию микроорганизмов. Содержание практикума составляют темы, каждая из которых в большей или меньшей степени соответствует одному из разделов общей бактериологии.

В пособие включены практические задания, рассчитанные на 14 лабораторных занятий. Содержание предлагаемой экспериментальной работы на каждом из них приведено после рассмотрения соответствующей темы. Для проверки и контроля самостоятельной работы и подготовки к занятиям и экзамену студентам предлагается заполнить ряд таблиц, а также самостоятельно оформить результаты поставленных экспериментов.

В пособии представлена программа курса и сформулированы ключевые вопросы, знание которых необходимо при выполнении контрольных тестовых заданий и на экзамене. Отдельно приведена структура итогового занятия, являющегося частью управляемой самостоятельной работы.

Данный практикум предназначен для студентов биологического факультета, обучающихся по специальностям «Биология», «Биохимия», «Биоэкология». Он может быть полезен студентам-микробиологам, биотехнологам, биохимикам, генетикам, фитопатоологам, т. е. специалистам в тех областях, где существует необходимость в ежедневной работе с микроорганизмами.

Все разделы пособия одинаково важны для изучения и представлены в максимально сжатом виде.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ОСНАЩЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

Микробиологические лаборатории обычно снабжены следующим оборудованием:

- биологическими иммерсионными микроскопами с дополнительными приспособлениями и наборами необходимых красителей;
- рН-метрами, дистилляторами, центрифугами, техническими и аналитическими весами, фотоэлектроколориметрами, аппаратурой для фильтрования и др.;
- набором инструментов: бактериологическими петлями, микробиологическими шпателями, пинцетами, спиртовками и др.;
- лабораторной посудой: пробирками, чашками Петри, колбами, флаконами, пипетками и др.;
- приборами для стерилизации оборудования, питательных сред и реактивов;
- необходимыми средствами пожарной и химической безопасности (огнетушителями, дезинфицирующими растворами и т. д.).

Основное правило работы в микробиологической лаборатории — четкая ее организация. При этом необходимо придерживаться следующих норм:

- к работе в лаборатории допускаются лица после прохождения инструктажа по технике безопасности;
- все должны работать в медицинских халатах; вход без халата воспрещен;
- в лаборатории запрещается курить, хранить и употреблять пищевые продукты;
- рабочее место должно содержаться в образцовом порядке, а личные вещи храниться в специально отведенных местах;

- при случайном попадании биологического материала на стол его необходимо тщательно вытереть дезинфицирующим раствором;
- результаты работы следует заносить в рабочий журнал, записи вести четко и аккуратно. Необходимо указывать:
 - название опыта, дату его постановки;
 - объект исследования и условия его проведения;
 - полученные результаты и сделанные выводы;
- после окончания работы нужно убрать рабочее место и вымыть руки.

2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Известно значительное количество питательных сред, используемых для культивирования и поддержания (сохранения) микроорганизмов. **Питательной средой** в микробиологии называют среду, содержащую различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Еще в 1930 г. М. Левин и Г. Шенлейн описали 2543 питательные среды и классифицировали не менее 2000 их наименований, однако число ингредиентов, являющихся неотъемлемыми компонентами сред, относительно невелико, а их композиции создаются на основе определенных общих принципов.

Для размножения разных бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и наличие биохимических питательных компонентов. Любая питательная среда для культивирования определенного вида микроорганизмов должна соответствовать следующим требованиям:

- содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме;
- иметь оптимальную влажность, чтобы вещества в ее составе находились в растворенном состоянии;
- характеризоваться определенной вязкостью, кислотностью, быть изотоничной, сбалансированной по содержанию отдельных химических элементов, с высокой буферной емкостью (по возможности прозрачной);
- быть стерильной.

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах достаточно просты: вода, диоксид углерода и соответствующие неорганические соли. Например, хемолитотрофные бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты.

Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO_2 , органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно для образования клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, бактерии *Escherichia coli* способны к росту на минимальной среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**. Организмы, которые нуждаются в их добавлении в ростовую среду, называются **ауксотрофными** по соответствующим соединениям. Этим термином особенно широко пользуются в литературе по генетике бактерий.

Организмы, способные к росту на простых средах, содержащих источник углерода и энергии, а также набор основных биогенных элементов (углерод, кислород, водород, азот, сера, фосфор), получили название **прототрофных**. Следует учитывать и то, что в природе встречаются бактерии, которые способны размножаться в местах с низким пищевым потоком углерода – до 0,1 мг/л в сутки. Они получили название **олиготрофных**; противоположную группу для них составляют **копиотрофные** бактерии, которые способны к росту на богатых пищевых субстратах.

Выбор питательной среды зависит не только от потребностей клеток, но и в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их основных особенностей.

По составу питательные среды разделяют на натуральные и синтетические. К **натуральным средам** относят те, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют неопределенный химический состав. Примерами являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, тканей животных), образующихся при их гидролизе, солодовое и пивное сусло, картофельный отвар, отвары злаков, настои сена, соломы и др.

Кислотный (НСI) или щелочной (NaOH) гидролиз белков используется для приготовления их полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина, панкреатина, папаина приводит лишь к частичному (неполному) гидролизу белков, в результате чего образуются **пептоны**. Они представляют собой смесь поли- и олигопептидов, органических азотных соединений, аминокислот, микроэлементов. Как правило, на пептонных питательных средах наиболее требовательные

микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. Отдельные компоненты таких сред могут использоваться не только как источники азота, но и как источники углерода.

При ферментативном гидролизе белка, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих небольшие пептиды, потому что могут усваивать их непосредственно, а отдельные аминокислоты в чистом виде — нет. Обычно в составе такой среды ферментативный гидролизат белка обеспечивает потребность в источниках азота, аминокислотах, используется как источник углерода и энергии; дополнительно внесенные соли удовлетворяют потребности бактерий в неорганических ионах, а дрожжевой экстракт обеспечивает клетки витаминами. Такие среды используются для наращивания биомассы, хранения микроорганизмов и т. п.

К числу сред неопределенного состава можно отнести и *среды полусинтетические*. В такие среды вносят известные соединения, явно необходимые для роста клеток, а также добавляют небольшое количество дрожжевого или кукурузного экстракта (или любого другого природного продукта) для обеспечения их неизвестных ростовых потребностей. Например, кукурузный экстракт содержит аминокислоты, витамины, большое количество органических кислот (молочной, уксусной и т. п.), минеральные соли. Такие среды часто используются в случае промышленного культивирования биологических объектов для получения продуктов их метаболизма.

Синтетические среды — это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Их обязательными составляющими являются неорганические соединения (соли), углерод- и азотсодержащие вещества (типичными примерами являются глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. Основное назначение этих питательных сред — изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетически измененных форм, на основании чего их можно отнести к *средам селективным*.

По назначению среды разделяют на селективные и дифференциально-диагностические. *Селективные среды* обеспечивают преимущественное развитие одной или нескольких физиологических групп микроорганизмов и менее пригодны для развития других. Например, для

преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавление в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %, при которой рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

Дифференциально-диагностические среды используются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности в клинической бактериологии и др. Принцип разработки состава таких сред основан на том, что отдельные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в питательную среду. В дифференциально-диагностические среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Так, *среда Эндо* позволяет отличить клоны клеток, сбраживающие лактозу до ацетальдегида, от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами данной среды являются питательный (пептонный) агар, лактоза и индикатор — основной фуксин, обесцвеченный сульфитом натрия (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют на ней бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом, в результате чего формируются колонии, окрашенные в интенсивный розовый или красный цвет, иногда с металлическим блеском.

Другим примером является *среда Левина*, в которой в качестве индикаторов содержатся эозин и метиленовый синий, исходно окрашенная в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие сбраживание лактозы, образуют колонии, окрашенные в синий с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Подобные изменения окраски происходят потому, что красители присутствуют в среде не в виде самостоятельных соединений, а в виде комплексов с ее питательными веществами. При низких значениях pH эти комплексы выпадают в осадок, исходные же красители в этих условиях растворимы; при высоких значениях pH комплексы красителей бесцветны, тогда как метиленовый синий приобретает синюю окраску. Данная среда позволяет дифференцировать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*.

Существуют среды, сочетающие свойства селективных и дифференциально-диагностических: например, *среда Плоскирева* содержит углевод (лактоза) и индикатор нейтральный красный (как в дифференциально-диагностических средах), а также бриллиантовый зеленый, угнетающий рост грамположительной микробиоты.

По консистенции среды бывают жидкими, полужидкими, твердыми (плотными), сыпучими (сухими). *Жидкие питательные среды* получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими. Рост микроорганизмов в жидкой среде может происходить в *периодической (закрытой)* системе; в этом случае после инокуляции среды не происходит ни добавления, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы. При *проточном (непрерывном)* культивировании характерна постоянная подача свежих питательных компонентов со скоростью, равной скорости удаления среды (открытая система). Такие среды используются для выявления физиолого-биохимических особенностей, накопления биомассы или продуктов метаболизма.

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии со времен Р. Коха. Наиболее важное их преимущество в том, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции. Твердые среды необходимы для получения чистых культур, количественного учета и хранения культур микроорганизмов, а также для диагностических целей.

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар-агар, желатин, силикагель, каррагинан. Наиболее распространенным из уплотнителей является *агар* — полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) используемые концентрации 1,5–2,0 % являются относительно невысокими, что весьма экономично.

Желатин — белок, приготовленный из сухожилий, кожи и костей, — в настоящее время используется для специальных целей (тест на разжижение желатина является таксономическим), однако образуемый им

гель плавится при температурах в диапазоне 25–30 °С, что является существенным недостатком. Кроме того, желатин разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов. Уплотняющая концентрация желатина 17–20 %.

Силикагелем называют соли двуокиси кремния (SiO_2). Его стерильный золь готовят из раствора силиката натрия и перед использованием, для того чтобы вызвать образование геля, к нему добавляют питательную среду, содержащую электролиты. Среды на основе силикагеля (1,5–2,0 %) используют для получения культур автотофных бактерий, так как при этом в них отсутствуют органические вещества. При добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно исследовать способность гетеротрофных бактерий использовать их в качестве единственных источников углерода. С помощью силикагелиевых сред можно также определять потребности бактерий в витаминах.

Каррагинан («растительный желатин») добывается путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Калиевые соли некоторых типов каррагинанов способны образовывать плотные (2 %) прозрачные гели, которые могут быть заменителями агары. Каррагинан значительно дешевле агары, не разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре – 55–60 °С.

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

Сыпучие (сухие) среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного органического сырья (чаще всего растительного происхождения). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или других ферментированных продуктов), сельском хозяйстве (силосование кормов), утилизации твердых и полужидких бытовых отходов. В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах – триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин), и среды, в которых присутствуют продукты природного происхождения (мясной перевар, кровяной агар и т. д.). Многие среды для клинической микробиологии выпускаются в сухом виде, их можно хранить длительное время. Кроме того, сыпучие среды стандартны по составу, удобны в хранении и транспортировке, хорошо растворимы в воде.

Выбор состава питательной среды для культивирования предполагает, что будут учтены не только особенности химического состава среды, но и такие биофизические факторы, как кислотность, температурные режимы культивирования, способ подачи и удаления молекулярного кислорода, освещенность, влажность, являющиеся определяющими для роста любой бактериальной культуры. При этом для различных групп микроорганизмов следует учитывать, что их значения неодинаковы. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования, окислительно-восстановительный потенциал зависит как от состава ростовой среды, так и от условий культивирования. Контроль окислительно-восстановительного потенциала особенно важен при культивировании облигатно-анаэробных бактерий.

Задание

Заполните табл. 1.

Таблица 1

Основные характеристики веществ, употребляемых для уплотнения питательных сред

Характеристика (свойство)	Агар	Желатин	Силикагель
Исходный материал для получения			
Основные составляющие компоненты			
Температура плавления, °С			
Температура застывания, °С			
Чувствительность к протеазам			
Используемая концентрация			

3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование (выращивание) микроорганизмов определяется не только составом питательной среды, но и физико-химическими факторами (температура, кислотность, аэрация, свет и т. д.). При этом количественные показатели параметров неодинаковы и зависят от особенностей метаболизма каждой группы микроорганизмов, целевой направленности и аппаратурного оснащения. Можно выделить методы культивирования на твердых, полужидких и жидких питательных средах, а также в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях. Характеристики этих процессов устанавливают путем измерения таких показателей, как число клеток или их биомасса.

Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды

Посев микроорганизмов осуществляется бактериологической петлей. Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки, прижимая пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время всех дальнейших манипуляций. Края открытой пробирки обжигают в пламени спиртовки и вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе. Оставшиеся на петле после посева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки.

При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде с последующим описанием характера их роста отмечают степень помутнения (слабая, умеренная или сильная), особенности образующейся пленки (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая), формирующийся осадок (плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный). Можно упомянуть появление пигментации или выделение газообразных продуктов.

Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

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

При описании роста по штриху отмечают следующие особенности: однородный, скудный, умеренный или обильный, сплошной, диффузный, перистый, ризоидный и т. д. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность, консистенцию.

2. *Посев на поверхность агаризованной среды в чашках Петри* можно производить с помощью бактериологической петли, микробиологического шпателя или методом реплик. При посеве петлей отбирают клетки микроорганизмов с агаризованной или жидкой среды, приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхности среды проводят штрихи, после чего чашку закрывают и помещают в термостат крышкой вниз.

При посеве микроорганизмов *из жидкой среды с использованием микробиологического шпателя* поступают следующим образом. На поверхность среды в чашке с помощью стерильной пипетки наносят заданный объем жидкой культуры. Одновременно, вращая чашку и делая круговые движения стерильным шпателем, суспензию распределяют по всей поверхности среды.

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

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

4. В особых случаях используют *выращивание бактерий в полужидких средах*, которые содержат уплотняющее вещество в низкой концентрации. Такие среды пригодны для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1–0,4 %-ного агара гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным

путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы растут в нижней части полужидкой среды.

Техника культивирования анаэробных микроорганизмов

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

1. **Культивирование в микроанаэроstate** — аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот 90 %, CO₂ и H₂ по 5 %.

2. **Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород.** В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия (Na₂S₂O₄), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой; туда же вносят анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность химических веществ и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

3. **Использование восстанавливающих агентов**, которые добавляют в большинство сред для снижения их окислительно-восстановительного потенциала: тиогликолата натрия, цистеина, дитиотреитола, аскорбиновой кислоты. Удаления кислорода из среды можно добиться

также в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслоить смесь масла и парафина (1 : 1), то будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов. Возможно использование полужидких (0,05–0,1 %-ного агара) сред для уменьшения конвенционных потоков.

4. Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями. В жидкой среде с восстанавливающими агентами перед инокуляцией анаэроба проводят культивирование, например *E.coli*, что приводит к удалению из среды остаточного кислорода. Перед инокуляцией анаэробов клетки *E.coli* убивают нагреванием. Существует и другая модификация метода. На одной половине чашки Петри засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.

Содержание кислорода можно контролировать с помощью некоторых химических веществ, например раствора резазурина, щелочного раствора глюкозы с метиленовым синим.

З а д а н и я

1. Проведите посевы культур микроорганизмов в жидкую и на плотную (скошенный агар) питательные среды.
2. Ознакомьтесь с техникой пересева микроорганизмов методом реплик.

4. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Цель и назначение процесса стерилизации состоят в полном удалении или уничтожении всех живых микроорганизмов, спор и других покоящихся форм внутри или на поверхности объектов окружающей среды. Стерилизации подвергаются питательные среды, лабораторная посуда, инструменты, растворы и т. д. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение: можно говорить только о стерильности либо нестерильности – состояния «частичной или неполной стерильности» не существует. Возможность и целесообразность использования того или иного способа стерилизации определяются несколькими факторами, в первую очередь физико-химическими свойствами материала, а также целью проведения исследования. Можно выделить термическую и холодную стерилизацию.

К методам термической стерилизации относятся: прокалывание и обжигание в пламени спиртовки (фламбирование); кипячение;

дробная стерилизация (тиндализация); пастеризация; сухожаровая (горячим паром) стерилизация; стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование). Использование двух последних способов предполагает гибель только вегетативных клеток микроорганизмов.

Прокаливание и обжигание в пламени спиртовки (фламбирование) – наиболее быстрый и доступный метод стерилизации. Однако его использование ограничивается только термоустойчивыми материалами. Таким методом стерилизуют бактериологические петли, иглы, шпатели, пинцеты, фарфоровые ступки и другие инструменты.

Кипячение – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30–60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в специальных закрытых приборах – стерилизаторах. В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко в связи с тем, что продолжительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности. Чаще всего кипячение используют для стерилизации растворов термолабильных веществ (сахара, аминокислоты и т. п.).

Дробная стерилизация (тиндализация, или стерилизация текучим паром) используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые содержат эндоспоры, но портятся при использовании температур выше 100 °С. Метод разработан в 1877 г. Дж. Тиндалем. Согласно методу, жидкость нагревают до 100 °С и продолжают выдерживать при данной температуре 10 мин. За это время все вегетативные клетки погибают, жизнеспособность сохраняют только споры. Затем жидкость охлаждают до температуры, оптимальной для прорастания спор (30 °С), и через несколько часов снова нагревают до температуры кипения. Трех-четырёх подобных циклов бывает достаточно для уничтожения всех имеющихся спор. Эффективность метода особенно велика потому, что нагревание обычно приводит к активации спор. Тиндализацию можно проводить с помощью пара, подаваемого от внешнего источника, либо в специальных аппаратах. Резервуар с кипящей водой располагают в нижней части аппарата, а над ним помещают сетку с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами.

Пастеризация заключается в однократном прогреве материала при температурах ниже 100 °С и направлена на уничтожение вегетативных клеток. Этот метод широко используется в пищевой промышленности для обработки продуктов, которые теряют вкусовую и пищевую

ценность при кипячении: молока, ягодных и фруктовых сиропов, соков, вин, пива и т. д. В микробиологической практике пастеризацией пользуются для получения накопительных культур спорообразующих бактерий. В лабораторных условиях пастеризацию проводят либо на водяной бане, либо в ультратермостате при следующих режимах: 60–70 °С в течение 15–30 мин; 80 °С в течение 10–15 мин.

Сухожаровая стерилизация, или **стерилизация сухим горячим воздухом**, проводится в сухожаровых шкафах. Режим стерилизации 160–170 °С на протяжении 2 ч. При этом предполагается, что погибают как клетки, так и споры. Таким способом стерилизуют стеклянную посуду, инструменты и др.

Стерилизация насыщенным паром под давлением, или **автоклавирование**, – один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию высокой температуры и повышенного давления пара. При этом погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных приборах – автоклавах (рис. 1), закрывающихся

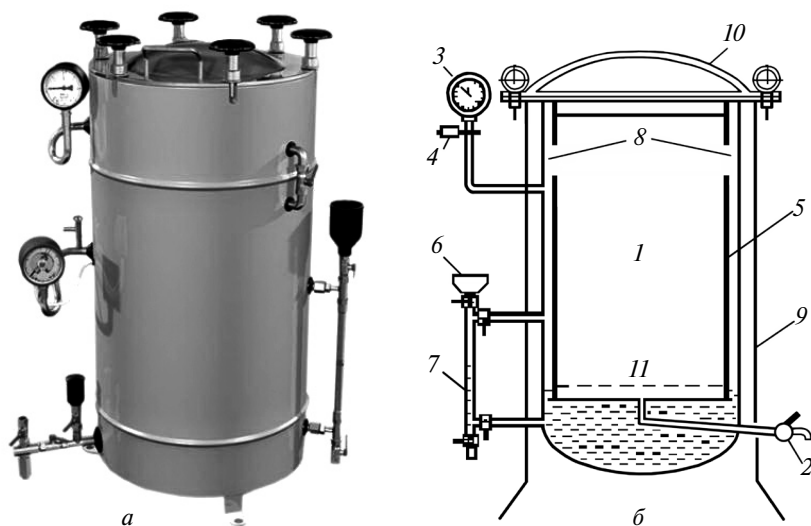


Рис. 1. Автоклав:

a – внешний вид; *б* – схема: 1 – стерилизационная камера; 2 – кран для выхода воздуха; 3 – манометр; 4 – предохранительный клапан; 5 – водопаровая камера; 6 – воронка для заполнения автоклава водой; 7 – водомерная трубка; 8 – отверстие для поступления пара в стерилизационную камеру; 9 – защитный кожух; 10 – крышка автоклава; 11 – подставка для размещения стерилизуемых предметов

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

При **холодной стерилизации** применяют химические вещества или проводят воздействие на объект факторами физической природы. Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов предполагают использование дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифический эффект, либо антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов с избирательным противомикробным действием.

Дезинфицирующие вещества классифицируются по группам: кислоты или щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые соли, фенольные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. Устойчивость микроорганизмов к их действию может существенно меняться в зависимости от таких факторов, как концентрация активного компонента, длительность контакта, рН, температура, влажность и присутствие органических веществ. Химическими средствами неспецифического действия обрабатывают помещения, оборудование, различные предметы. Например, спирты используются в концентрации 60–70 % и эффективны в отношении вегетативных клеток. Фенолы и их производные применяются для дезинфекции помещений и дезинсекции.

Среди летучих стерилизующих веществ можно отметить окись этилена, окись пропилена, озон, метилбромид, формальдегид, глутаровый альдегид. Указанные вещества используют для стерилизации пластмассовых центрифужных пробирок, пластмассовых чашек Петри, оптических инструментов, сывороток крови и др.

Стерилизация фильтрованием применяется к веществам, которые не выдерживают термической обработки (растворы белков, углеводов, витаминов, антибиотиков; углеводороды; сыворотки). Способ заключается в пропускании жидкостей и газов через специальные мелкопористые фильтры, диаметр пор которых меньше размеров самых мелких клеток или вирусов. Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление.

Существуют два основных типа фильтров – *глубинные* и *мембранные*. Глубинные состоят из волокнистых или гранулированных материалов,

которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, и захват ими частиц определяется размером пор. Фильтры изготавливают из различных природных (коалин, асбест, целлюлоза) или синтетических (производные целлюлозы) материалов. Различают фильтры: мембранные, получаемые на основе нитроцеллюлозы; асбестовые, или фильтры Зейтца, получаемые на основе смеси асбеста и целлюлозы; фарфоровые, или свечи Шамберлана, получаемые из смеси кварцевого песка и коалина, сплавленных между собой; стеклянные, получаемые из стекла «Пирекс».

Стерилизация с использованием облучения пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые лучи (250–270 нм) используются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток, материалов из термолабильной пластмассы, воздуха в помещениях. Доза облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, степенью и видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые устойчивее в 3–10 раз. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью или другими материалами. Ограничением при использовании данного метода стерилизации является низкая проникающая способность УФ-лучей и высокая поглощающая способность воды и стекла.

Рентгеновское и γ -облучение также эффективны для стерилизации пластмасс, пищевых продуктов, но требуют строгого соблюдения правил безопасности. К γ -облучению наиболее чувствительны вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад. Гамма-облучение используется для стерилизации больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, стероидов, разового пластмассового оборудования, шовного и перевязочного материала и др.

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

Следует отметить, однако, что в настоящее время все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

Задания

1. Ознакомьтесь с техникой подготовки посуды и инструментов для стерилизации. Ознакомьтесь с работой автоклава, сухожарового шкафа.
2. Заполните табл. 2.

Таблица 2

Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

Стерилизуемый материал (объект)	Метод и режим стерилизации	Примечание
Натуральные жидкие и агаризованные питательные среды		
Синтетические жидкие и агаризованные среды		
Среды или их компоненты, содержащие углеводы, аминокислоты, витамины и т. п.		
Химическая посуда (чашки Петри, пипетки, пробирки и т. п.)		
Металлические и стеклянные инструменты		
Мембранные фильтры		
Стеклянные фильтры		
Оборудование из термолабильных материалов		
Лабораторные и другие помещения в учреждениях здравоохранения		

5. ПОДДЕРЖАНИЕ (ХРАНЕНИЕ) КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Основная задача хранения культур – поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и практики. Проблема длительного хранения микроорганизмов сводится к созданию условий анабиоза, т. е. к торможению процессов обмена веществ. Хранение микроорганизмов осуществляется в специальных коллекциях типовых культур. При этом должен осуществляться постоянный контроль: 1) стабильного сохранения свойств; 2) сохранения жизнеспособности; 3) отсутствия загрязнения посторонней микробиотой; 4) отсутствия накопления любых мутаций.

В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими посевами (субкультивирование); 2) хранением под слоем минерального масла; 3) высушиванием; 4) лиофилизацией; 5) хранением в условиях низких и ультранизких температур.

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

Хранение под слоем минерального масла заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным маслом (например, вазелиновым). Слой масла (0,5–1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов, рост и старение клеток, предохраняет поверхность среды от высыхания. Покрытые маслом культуры хранят в холодильнике. Большинство сапротрофных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение нескольких месяцев или даже лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересевая через 2–3 года. Хранение под маслом имеет следующие преимущества: относительно длительное сохранение стабильности свойств микроорганизмов, сокращение затрат на пересевы.

Высушивание – простейший метод хранения микроорганизмов, в процессе которого происходит обезвоживание микробных клеток. В высушенных (до остаточной влажности 10–12 %) клетках биохимические реакции приостанавливаются или протекают очень медленно. Процесс высушивания лучше всего переносят спорообразующие виды. Так, споры *Bacillus anthracis*, приготовленные еще Л. Пастером, остались жизнеспособными через 68 лет хранения. Широко применяют воздушное высушивание микроорганизмов на различных адсорбентах: стерильной почве, песке, глине, фильтровальной бумаге, стеклянных бусах, крахмале и т. д. Адсорбенты защищают микроорганизмы от сильного высыхания, связывают свободную воду и поддерживают определенный уровень влажности. Разновидностью метода является *L*-высушивание, или высушивание из жидкого состояния: микроорганизмы в суспензионной среде высушивают под вакуумом в стеклянных ампулах, погруженных в водяную баню с контролируемой температурой. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать, они широко используются для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, бактериальных удобрений (нитрагин, азотобактерин и др.), энтомопатогенных препаратов.

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

Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах (криоконсервация) используется в тех случаях, когда культуры не выдерживают лиофилизации (некоторые автотрофные бактерии, спирохеты, микоплазмы, водные грибоподобные микроорганизмы, различные вирусы). Микроорганизмы замораживают в рефрижераторах (от –12 °С до –80 °С) или в рефрижераторах с азотом: газовой-фазовых (–150 °С) либо жидко-фазовых (–196 °С). Считается, что грамположительные бактерии более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные.

При хранении бактерий в жидком азоте используют *криопротекторы* двух типов: 1) глицерин и диметилсульфоксид, которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту; 2) сахарозу, глюкозу, полиэтиленгликоль, которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. По 0,5–1,0 мл суспензии клеток (плотность 108 кл/мл) разливают в специальные ампулы и запаивают их. Далее проводят двухэтапное охлаждение: с медленной (снижение температуры 1 °С/мин) и быстрой (снижение температуры 15–30 °С/мин) скоростью. Для восстановления жизнеспособности замороженных культур их быстро оттаивают при 37 °С. К основным преимуществам криогенного сохранения микроорганизмов можно отнести: малую вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, небольшие временные

и материальные затраты, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята при восстановлении.

Жизнеспособность клеток после различных сроков хранения определяют путем посева на богатые питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Процент выживаемости измеряют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному, принимаемому за 100 %. Сравнительный анализ использования различных методов хранения культур микроорганизмов приведен в табл. 3.

Таблица 3

Сохранение жизнеспособности бактерий при использовании различных методов их хранения

Род бактерий	Частота пересевов, месяцы	Время выживания, годы				
		в дистиллированной воде	под минеральным маслом	в стерильной почве	при замораживании	после лиофилизации или в жидком азоте
<i>Actinomyces</i>	1	—	—	1–2	2–3	>30
<i>Agrobacterium</i>	1–2	0,5	1–2	1–2	—	>30
<i>Bacillus</i>	2–12	1	1	1–2	2–3	>30
<i>Bifidobacterium</i>	еженед.	—	—	—	—	>30
<i>Clostridium</i>	6–12	1	1–2	—	2–3	>30
<i>Escherichia</i>	1–4	1	1–2	—	—	>30
<i>Erwinia</i>	1–4	—	1–2	—	—	>30
<i>Neisseria</i>	1	1	1	—	1–2	>30
<i>Nocardia</i>	1–4	—	1	—	1–2	>30
<i>Pseudomonas</i>	1–3	0,5	—	—	1	>30
<i>Streptococcus</i>	1–2	0,5	1	—	—	>30
<i>Streptomyces</i>	1–8	0,5	1–2	2–3	1–3	>30
<i>Xanthomonas</i>	1–8	—	—	—	1–2	>30

Примечание: «—» — нет данных.

6. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

Основные задачи микроскопии:

- выявление микроорганизмов в различных материалах;
- количественное определение содержания микроорганизмов в исследуемом материале;
- ориентировочная идентификация микроорганизмов в исследуемом образце;

- изучение некоторых морфологических признаков и наличия структур в клетках микроорганизмов (например, капсул, жгутиков и т. д.);
- изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

В настоящее время используется световая микроскопия (рис. 2), обеспечивающая увеличение объектов в сотни раз, и электронная микроскопия – в десятки тысяч раз. Световая микроскопия включает обычную просвечивающую (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминисцентную формы. В последнее время разработаны типы микроскопии и соответственно микроскопов других видов: инверсионная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

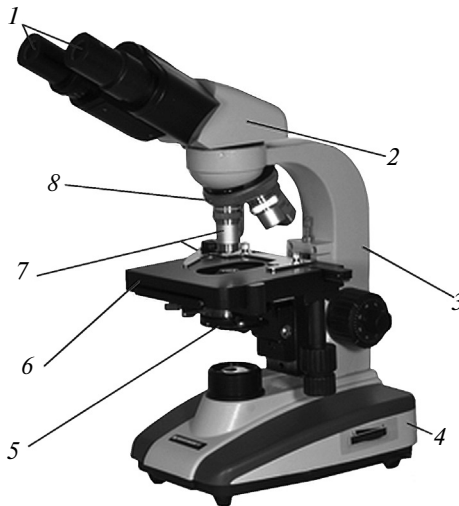


Рис. 2. Световой микроскоп:

- 1 – комплект окуляров; 2 – бинокулярная насадка; 3 – штатив;
 4 – основание; 5 – конденсор; 6 – предметный столик;
 7 – комплект объективов; 8 – револьверное устройство

Светлопольная микроскопия позволяет исследовать объекты в проходящем свете в светлом поле. Данный вид микроскопии предназначен для исследования морфологии, размеров клеток, их взаимного расположения, структурной организации и других особенностей. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм (минимальное расстояние, при котором различимы два объекта). Общее увеличение складывается из произведения увеличений объектива и окуляра. Разрешение микроскопа можно увеличить за счет увеличения

коэффициента преломления (иммерсии). В микроскопии применяют несколько иммерсионных систем: масляную, глицериновую, водную.

При работе с микроскопом «Биолам» производят следующие действия:

1. Осветитель устанавливают под конденсором в специальное гнездо в основании микроскопа. При этом необходимо снять зеркало, поднять до упора конденсор, отвести в сторону его дополнительную линзу. Затем, перемещая патрон осветителя, добиваются наиболее интенсивного и равномерного освещения поля зрения. Для этого используют суховоздушный объектив малого увеличения ($\times 8$). При использовании современных микроскопов, имеющих вмонтированный источник света, проведение данного этапа не требуется.

2. В центральной части столика микроскопа устанавливают препарат.

3. Если дальнейшие исследования проводят с суховоздушным объективом ($\times 40$), то следует прикрыть диафрагму конденсора, перевести револьвер микроскопа на данное увеличение и опустить вниз тубус микроскопа с помощью микровинта до появления в поле зрения исследуемых объектов.

4. Если исследования проводятся с помощью иммерсионной системы (увеличение $\times 90$), то в центр препарата следует поместить каплю иммерсионного масла, очень осторожно опустить тубус микроскопа вниз таким образом, чтобы дотронуться до предметного стекла, затем, глядя в окуляр, поднять объектив вверх с помощью макровинта до появления в поле зрения микроорганизмов в плоскости препарата. С помощью микровинта добиваются максимальной четкости изображения. На объективе, предназначенном для использования иммерсионной системы, нанесены обозначения МИ (масляная иммерсия), ВИ (водная иммерсия) или цветное кольцо.

5. После просмотра всех препаратов следует снять масло с иммерсионного объектива сухой хлопчатобумажной салфеткой, перевести микроскоп на малое увеличение, снять осветитель, опустить конденсор и тубус микроскопа вниз до упора. Хранить микроскоп следует в условиях, предотвращающих попадание пыли на линзы.

Фазово-контрастная микроскопия ценна тем, что с ее помощью можно наблюдать живые объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды, не прибегая к их фиксации и окрашиванию. С точки зрения увеличения никакого выигрыша нет, однако прозрачные объекты видны более четко, чем в проходящем свете обычного светлопольного микроскопа. При отсутствии соответствующего микроскопа обычный световой может быть оснащен специальным фазово-контрастным устройством, которое переводит фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные, в результате чего живые прозрачные объекты становятся контрастными и видимыми в поле зрения.

С помощью фазово-контрастной микроскопии изучают форму, размеры, взаимное расположение клеток, их подвижность, размножение, прорастание спор микроорганизмов и т. д.

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если в исследуемом препарате содержатся клетки микроорганизмов, то косые лучи отражаются от их поверхности, отклоняются от своего первоначального направления и попадают в объектив. На интенсивно черном фоне видны сияющие объекты. Такое освещение препарата достигается использованием специального темнопольного конденсора, которым заменяют обычный конденсор светлопольного микроскопа.

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

Люминесцентная микроскопия основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей светиться под действием падающего на них света. Микроорганизмы, содержащие хлорофилл, витамин В12, алкалоиды, некоторые антибиотики, обладают первичной люминесценцией. Клетки микроорганизмов, в которых люминесценция слабо выражена или отсутствует, обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, примулин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500 – 1:100 000. Это называется наведенной или вторичной люминесценцией.

Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и различным образом люминесцируют. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это позволяет применять данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнеспособности клеток, изучения микроорганизмов в почве, воде и т. д. Проведение люминесцентной микроскопии предполагает использование специальных микроскопов.

Разработанные на основе люминесцентной микроскопии **иммуно-флуоресцентные методы** применяются для визуализации иммунохимических реакций, основанных на специфическом взаимодействии антигена изучаемого объекта и меченых флуоресцентными красителями антител.

Электронная микроскопия позволяет обнаружить объекты, которые не визуализируются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Короткая длина волны электронов, уменьшающаяся в прямой зависимости от подаваемого ускоряющего напряжения, позволяет различить объекты размером 0,5–1,0 нм (или больше чем 0,0002 мкм). В современных электронных микроскопах достигается увеличение на экране или пленке 5000–15 000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих клетки бактерий и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект называется *негативным контрастированием*.

Детали внутреннего строения выявляют на срезах бактерий, залитых в полимерный материал. Предварительно бактерии фиксируют и обрабатывают солями тяжелых металлов для получения необходимого контраста. Часть электронов проходит через образец, а другие рассеиваются компонентами структуры, в результате чего формируется изображение на экране или пленке. Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют *просвечивающим* (или *трансмиссионным*).

В *сканирующем (растровом) микроскопе*, как следует из названия, пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое формирует изображение на светящемся экране. Этот микроскоп дает картину поверхностей и позволяет получать сразу трехмерное изображение.

При *методе сколов (замораживание – оттаивание)* проводят изучение внутреннего строения клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии криопротектора и используют для получения сколов. Плоскости скола проходят через гидрофобную середину двойного слоя липидов. Обнаженную внутреннюю поверхность мембран оттеняют платиной. Полученные реплики изучают в сканирующем электронном микроскопе.

Помимо вышеуказанных разработаны и другие методы визуализации:

- *компьютерная интерференционная микроскопия* позволяет получить высококонтрастное изображение при наблюдении субклеточных структур;
- *лазерная конфокальная микроскопия* дает возможность получить отчетливое изображение и наблюдать объекты в фокусе по всему полю. При сочетании с компьютерной техникой возможна пространственная реконструкция изучаемого объекта;
- *рентгеновская микроскопия и позитронная эмиссионная томография* позволяют наблюдать объекты не в вакууме, а в обычных условиях.

7. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

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

Кокки (сферические); их клетки могут располагаться одиночно – микрококки, попарно – диплококки (например, нейссерия), квадратами по четыре клетки – тетракокки, пакетобразно «этажами» – сарцины, цепочками – стрептококки, бесформенными скоплениями в виде виноградных гроздьев – стафилококки. Диаметр клеток 1–2 мкм.

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

Извитые бактерии бывают трех типов: вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы изогнуты в виде запятой (холерный вибрион, кампилобактер); спириллы формируют несколько крупных завитков (возбудитель возвратного сыпного тифа); спирохеты имеют вид тонких спиралевидных клеток со множеством завитков и петель (возбудитель сифилиса).

Нитчатые бактерии – это цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или дисковидных клеток. Типичные представители – бактерии, окисляющие серу (роды *Beggiatoa*, *Thiotrix*).

К **мицелийобразующим бактериям** относятся истинные актиномицеты с сильно разветвленным мицелием. У коринеподобных бактерий клетки имеют не только тенденцию к ветвлению: при росте культуры наблюдается их плеоморфизм.

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

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

Архебактерии представляют собой обособленную группу бактерий с клеточной стенкой уникальной структуры, не содержащей пептидогликана муреина. Морфологически клетки могут быть неправильной формы, сферическими, палочковидными, а также в виде пластинок и коробочек разнообразной геометрической формы, сходных с кусочками битого стекла.

Выбор методов или способов окраски определяется конкретной целью исследования. Однако для приготовления препаратов существует ряд принципиальных методических приемов, которые лежат в основе использования большинства из них. Прежде всего это подготовка предметных стекол для приготовления препаратов. Толщина стекол должна составлять 1,2–1,4 мм. Более толстые стекла резко снижают четкость изображения, и их применение недопустимо при работе с иммерсионным объективом. Поверхность стекла должна быть хорошо обезжирена и очищена, что в повседневной работе достигается тщательным натиранием сухим мылом с последующим его удалением чистой хлопчатобумажной тканью или ватой. Хороший эффект может давать протирание вымытых стекол эфиром или обжигание их поверхности в пламени спиртовки. Хранят стекла, приготовленные для микроскопирования, в сухом состоянии или в этаноле.

Покровные стекла также должны быть хорошо вымыты и высушены. Их толщина составляет 0,15–0,17 мм.

В микробиологической практике для изучения морфологии бактериальных клеток можно использовать неокрашенные (нативные, прижизненные) или окрашенные (фиксированные) препараты (мазки), приготовленные из естественных образцов либо из колоний выросших микроорганизмов. При этом следует помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию клеток.

Нативные препараты готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространены методы «раздавленной капли», «висячей капли», микрокамеры с плотными средами, препарат «отпечаток». При помощи таких технологий можно исследовать форму и взаимное расположение клеток, их подвижность, рост, спороношение и т. д. Препараты живых клеток часто рассматривают с «сухими системами» (т. е. без иммерсии) микроскопа. Для прижизненного изучения бактерий используют светлопольную, фазово-контрастную, темнопольную и люминесцентную микроскопию.

Препарат «раздавленная капля» готовят на предметном стекле, куда наносят каплю воды. В нее стерильной бактериологической петлей вносят небольшое количество исследуемой культуры, эмульгируют и накрывают покровным стеклом. Избыток жидкости удаляют филь-

травальной бумагой. Если исследуют бульонную культуру, то на предметное стекло наносят непосредственно ее каплю. Препарат микроскопируют с использованием суховоздушной или иммерсионной системы (увеличение $\times 40$ или $\times 90$).

Препарат «висячая капля» используют при продолжительном наблюдении за ростом и развитием микроорганизмов. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов помещают с помощью бактериологической петли на стерильное покровное стекло. Стекло переворачивают каплей вниз и накладывают на лунку специального предметного стекла. Капля должна свободно висеть в лунке, не затрагивая ее краев и дна. Для создания влажной камеры и предохранения от высыхания края лунки смазывают вазелином. Микроскопируют так же, как и препарат «раздавленная капля».

Микрокамеры с плотными средами готовят на стерильных предметных стеклах, на которые тонким слоем наносят расплавленную агаризованную питательную среду. После ее застывания в центр с помощью пастеровской пипетки или бактериологической петли помещают суспензию бактерий. Вокруг выбранной области лишнюю среду удаляют, сверху помещают покровное стекло. Для предотвращения высыхания такие препараты либо инкубируют в закрытой камере, либо герметизируют щели между стеклами путем заливки парафином или воском. Этот способ микроскопирования позволяет вести наблюдение за процессами роста и размножения, исследовать циклы развития, влияние на эти процессы каких-либо агентов. На таких препаратах не нарушается естественное расположение растущих клеток.

Препарат «отпечаток» готовят из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном. К выросшей культуре сверху прикладывают чистое покровное стекло, слегка прижимают пинцетом и снимают. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в раствор воды или метиленового синего на предметном стекле. Препараты типа «отпечаток» можно фиксировать и окрашивать, они хранятся длительное время. Часто приготовленные таким образом препараты используют при изучении спорозооциции у актиномицетов.

Окрашенные (фиксированные) препараты бактерий готовят в следующей последовательности.

1. **Приготовление мазка:** на чистое и обезжиренное предметное стекло наносят культуру исследуемого микроорганизма либо в капле воды, либо в виде суспензии, тщательно размешивают и распределяют по поверхности стекла максимально тонким слоем для того, чтобы мазок быстрее высыхал.

2. **Высушивание мазка** проводят при комнатной температуре.

3. *Фиксация мазка* чаще всего осуществляется термически (фламбированием). Хотя данный метод является достаточно грубым, он позволяет сохранить интактную морфологию и отношение бактерий к красителям. Препарат проносят 2–4 раза над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони оно вызывало легкое жжение).

Фиксация мазка преследует определенные цели: а) инактивацию микроорганизмов; б) закрепление их на поверхности стекла и предотвращение смывания при последующем окрашивании; в) повышение восприимчивости клеток к красителям, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

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

Техника приготовления препаратов для окрашивания заключается в следующем. Фиксированный мазок помещают на параллельные стеклянные рейки, которые расположены над кюветой. На мазок наносят один или последовательно несколько красителей (например, 1 %-ный водный раствор фуксина или метиленового синего на 1–2 мин). Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя не подсыхал. После завершения окрашивания препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают, аккуратно промокая его фильтровальной бумагой, наносят на окрашенный сухой мазок каплю иммерсионного масла и микроскопируют с иммерсионной системой. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое.

Окрашивание препаратов проводится с помощью красителей, которые можно разделить:

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

- на кислые (эозин, конго красный) и щелочные (гематоксилин, толудиновый синий, азур). Кислые красители связываются с веществами, имеющими щелочную реакцию (например, цитоплазматическими белками), щелочные – с базофильными (кислыми) компонентами клеток (нуклеиновыми кислотами, рибосомами). Основные красители наиболее часто используются в микробиологических исследованиях.

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

Способность клеток воспринимать различные красители отражает их *тинкториальные свойства*, что определяется структурой и составом клеточной стенки. Выделяют простые и сложные (дифференцирующие) методы окраски.

Окрашивание препаратов каким-либо одним красителем относится к *простым методам*. Чаще всего при этом применяют фуксин, генциановый фиолетовый, метиленовый синий. В случае использования негативных красителей среда, в которой находятся микроорганизмы, становится полупрозрачной, поэтому клетки, в которые краситель не проникает, выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном фоне. Окрашивание проводят в течение 1–3 мин. В результате некоторые микроорганизмы, например спирохеты, плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко обнаруживаются при окрашивании негативными красителями. Споры при окрашивании негативными красителями имеют вид преломляющих свет включений в вегетативной клетке.

При *сложных методах* окрашивания на один препарат воздействуют несколькими красящими веществами, одно из которых — *основное*, а другие — *дополнительные*. Кроме красителей используются различные обесцвечивающие вещества: спирты, кислоты, ацетон и др. С помощью сложных методов окрашивания выявляют цитологические особенности клеток микроорганизмов (клеточные структуры, запасные вещества, включения и т. д.).

Окраска по методу Грама — один из наиболее универсальных и часто используемых сложных методов окраски. Окраска положена в основу дифференциации бактерий, является важнейшим таксономическим признаком и отражает способность клеток воспринимать и удерживать внутри красящий комплекс генцианового фиолетового и йода либо терять его после обработки спиртом. Соответственно по результатам окраски выделяют грамположительные (*Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Sarcina etc.*) и грамотрицательные (*Escherichia, Pseudomonas, Erwinia, Neisseria, Rickettsia etc.*) роды и виды бактерий.

Техника:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и на него наносят карболовый раствор генцианового фиолетового. Окрашивание проводят на протяжении 1–2 мин.

2. Бумажку снимают, краситель сливают и, не промывая препарат водой, обрабатывают его на протяжении 1–2 мин раствором Люголя до почернения.

3. Сливают раствор Люголя, окрашенный мазок обесцвечивают 96 %-ным этиловым спиртом (препарат несколько раз помещают в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек). Обесцвечивание проводят не более 30 с.

4. Препарат промывают водой.

5. Мазок дополнительно окрашивают на протяжении 1–2 мин водным раствором фуксина.

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

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

Определить грампринадлежность бактерий можно и без окрашивания клеток с использованием теста Грегерсена. Для этого можно воспользоваться качественной реакцией с 3 %-ным раствором КОН. На предметное стекло наносят каплю реактива, в которую стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую чистую культуру бактерий. Тщательно перемешивают в течение 30 с и определяют вязкость полученной суспензии. При образовании вязких слизистых тянующихся нитей исследуемые клетки относят к грамотрицательным. Если вязкость суспензии не изменилась, то клетки являются грамположительными.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля – Нильсена. Кислотоустойчивые бактерии не окрашиваются обычными методами, однако если при постановке метода используют фенол, детергенты или нагревание, то удается получить окрашенные клетки. В этом случае окраска клеток сохраняется даже при последующем обесцвечивании в смеси «кислота – спирт». Кислотоустойчивость обусловлена большим содержанием в клетке сложных липидов, в частности миколовых кислот. К числу кислотоустойчивых относятся бактерии родов *Mycobacterium*, *Nocardia* и др.

Техника:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги и на него наносят карболовый раствор фуксина, приготовленный по Цилю.

2. Мазок с красителем 2–3 раза подогревают до появления паров, держа его в пламени спиртовки.

3. Препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и промывают водой.

4. Окрашенный мазок обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты (препарат помещают 2–3 раза в стаканчик с кислотой, не задерживая в ней).

5. Препарат промывают водой и докрашивают на протяжении 3–5 мин метиленовым синим по Леффлеру.

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некисло-тоустойчивые – в синий.

З а д а н и я

1. Проведите окраску бактерий зубного налета с использованием простых методов.

2. Проведите окраску смеси бактерий по методу Грама.

3. Проведите окрашивание смеси кислотоустойчивых и некисло-тоустойчивых бактерий.

Эндоспоры бактерий

Спорообразование свойственно бактериям нескольких родов, к числу которых относятся представители *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum* etc. Обычно внутри каждой клетки образуется одна спора, которая может размещаться центрально (у бацилл), центрально, субтерминально или терминально, превышая диаметр материнской клетки (у клостридий). Это приводит к формированию у клостридий клеток веретеновидной формы (*Clostridium perfringens*), а также в форме ракетки или барабанной палочки (*Clostridium tetani*). Бактериальные споры устойчивы к высокой температуре, высушиванию, воздействию токсических веществ и других неблагоприятных факторов.

Бактериальные споры могут быть выявлены как простыми, так и сложными методами окраски. Например, при использовании 7 %-ного водного раствора нигрозина (простой метод) клетки становятся зелеными, споры – бесцветными, а фон – черным. Наиболее часто применяемым сложным методом окрашивания эндоспор является *метод Шеффера – Фултона*.

Т е х н и к а:

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5 %-ный водный раствор малахитового зеленого и 2–3 раза нагревают в пламени спиртовки до появления паров.

2. Фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой и в течение 30 с докрашивают 0,5 %-ным раствором сафранина (или фуксина).

3. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой.

Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

Капсула бактерий

При определенных условиях культивирования (особенно при росте на средах, богатых углеводами) многие виды бактерий различных таксономических групп образуют слизистое вещество, формирующее вокруг клетки структуру, которая называется *капсулой*. Колонии капсулообразующих бактерий имеют влажную, блестящую поверхность и называются *мукоидными*. Среди сапротрофных бактерий капсула хорошо выражена у представителей родов *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Rhizobium*, среди патогенных – у *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и др.

Капсула предохраняет клетку от обезвоживания и механического повреждения. Капсульное вещество создает вокруг клетки дополнительный осмотический барьер, регулирующий поступление и выделение различных веществ и ионов, а также аэрацию бактерий. Лучше всего капсулы выявляются во влажных препаратах, так как составляющие их сильно гидратированные коллоидные полимеры легко разрушаются и сокращаются в размерах при высушивании и фиксации.

Для выявления капсул пользуются различными методами, среди которых можно отметить *метод Гинса – Бурри* (метод негативного контрастирования).

Техника:

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

2. Рядом с первой каплей помещают каплю туши. Две капли смешивают и с помощью другого предметного стекла делают мазок как мазок крови (ребром одного стекла проводят по поверхности другого).

3. Мазок высушивают на воздухе.

4. Препарат микрокопируют, пользуясь иммерсионной системой.

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

Цитоплазматические включения

У многих микроорганизмов, выращиваемых в определенных условиях, в процессе метаболизма синтезируются вещества, которые не секретируются из клетки наружу, а откладываются в цитоплазме. Такие вещества называются резервными или запасными и относятся к *цитоплазматическим включениям*. Среди них – отложения жироподобных веществ, полифосфатов, полисахаридов, серы и различных кристаллов. Для выявления этих включений, которые сильно преломляют свет, применяется несколько методов.

Включения волютина (полифосфатов), служащие источником фосфатных групп, хорошо выражены у *Spirillum volutans*, *Bacillus subtilis*, а также у возбудителей сибирской язвы и дифтерии. Гранулы волютина имеют относительно крупные размеры, окрашиваются различными красителями, изменяя цвет последних. Например, при обработке метиленовым синим волютин окрашивается в ярко-красный цвет. Такое явление получило название *метахромазии*.

Окраска гранул волютина по Нейссеру.

Техника:

1. На фиксированный мазок наносят 2–3 капли раствора метиленового синего по Нейссеру и окрашивают в течение 1–2 мин.
2. Краситель сливают, препарат промывают водой.
3. Мазок обрабатывают раствором Люголя в течение 20–30 с.
4. Не промывая препарат водой, мазок дополнительно окрашивают 2–3 мин 2%-ным раствором везувина.
5. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют, используя иммерсионную систему.

Цитоплазма окрашивается в желтый цвет, а гранулы волютина – в темно-синий.

В клетках некоторых микроорганизмов наличие гранул волютина можно выявить, используя и простые методы окрашивания. Для этого на фиксированный мазок (например, клеток дрожжей) наливают метиленовый синий по Леффлеру и клетки окрашивают в течение 10 мин. Краситель сливают, клетки промывают водой и микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки приобретают голубой, а зерна волютина – фиолетово-красный цвет.

Гранулы углеводной природы (полисахариды) выявляют при обработке клеток раствором Люголя. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Гранулы крахмалоподобного вещества – гранулезы (легко выявляются в клетках *Clostridium*) окрашиваются в синий, а гранулы гликогенподобных полисахаридов (дрожжи) – в красновато-коричневый цвет.

Подвижность бактерий

Поступательное движение бактерий за счет жгутиков можно наблюдать во влажных прижизненных препаратах, применяя в большинстве случаев светлопольный микроскоп; эффективно наблюдение за подвижностью клеток также и в темнопольном микроскопе. Чтобы убедиться, что жгутики действительно присущи данным микроорганизмам, а также определить их расположение (монотрихальное, лофотрихальное,

амфитрихимальное, перитрихимальное), требуются методы с применением окрашивания. Данное свойство является диагностическим таксономическим критерием, особенно при идентификации грамтрихимальных палочковидных бактерий.

Для окрашивания жгутиков предложено несколько методов, общим этапом которых является протравливание препарата (обычно растворами таннина, $KAl(SO_4)_2$, $HgCl_2$) и последующая окраска (чаще карболовым раствором фуксина). В результате этого на жгутиках происходит осаждение красителя, благодаря чему одновременно достигается как увеличение их толщины, так и уменьшение прозрачности. Одним из предложенных методов окрашивания жгутиков является *метод Лейфсона*.

Техника:

1. Выращенные на скошенном агаре бактерии осторожно ресуспендируют в пептонной воде. Бактериологической петлей суспензию наносят на предметное стекло и высушивают на воздухе.

2. Восковым стеклоглафом очерчивают вокруг бактериальной пленки прямоугольник.

3. Наносят на предметное стекло 1 мл раствора красителя таким образом, чтобы он не вытекал за пределы восковой линии, и не допускают подсыхания. Оставляют краситель на определенное время (до 1 ч). В состав красителя входят 1,5 % хлористого натрия, 3 % таннина (дубильной кислоты) и 0,03 % фуксина.

4. Как только на поверхности красителя образуется золотистая пленка, а по всему мазку выпадет осадок, краситель удаляют под струей воды, а препарат высушивают на воздухе.

5. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

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

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

Выявление нуклеоида

Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи световой микроскопии трудно. Кроме того, основные красители, избирательно окрашивающие хроматин, равномерно и интенсивно окрашивают всю прокариотическую клетку.

Для выявления нуклеоида в бактериальных клетках на предметном стекле делают мазок суточной культуры, высушивают его на воздухе и фиксируют, используя жидкость Карнуа или метиловый спирт. Затем препарат опускают на 2–3 мин в раствор 1 н. HCl для гидролиза рибосомальной РНК, немедленно промывают водой, помещают в раствор 1 %-ного формалина, окрашивают 1–2 мин раствором основного фуксина. Препарат промывают, высушивают, микроскопируют с иммерсионной системой. *Цитоплазма окрашивается в розовый, нуклеоид – в ярко-малиновый цвет.* Довольно четко нуклеоид может быть обнаружен в клетках *Azotobacter chroococcum*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus megaterium*.

Задания

1. Выявите наличие эндоспор в клетках бактерий с использованием сложных методов окрашивания.
2. Выявите наличие капсул у бактерий с использованием сложных методов окрашивания.
3. Выявите наличие волютиновых гранул в клетках дрожжей простыми методами.
4. Определите подвижность бактерий методом укола в столбик 0,3 %-ного питательного агар.

Таблица 4

Характеристика морфологических, тинкториальных и биологических особенностей микроорганизмов

Вид микроорганизмов	Грампринадлежность	Кислотоустойчивость	Наличие			Подвижность	Форма и взаимное расположение клеток	Биологические особенности и распространение
			эндоспор и других покоящихся форм	наружных слоев клетки, состав	запасных веществ, состав			
<i>Escherichia coli</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>								
<i>Pectobacterium carotovorum</i>								
<i>Bacillus subtilis</i>								
<i>Sarcina lutea</i>								
<i>Mycobacterium rubrum</i>								

Вид микроорганизмов	Грампринадлежность	Кислотоустойчивость	Наличие			Подвижность	Форма и взаимное расположение клеток	Биологические особенности и распространение
			эндоспор и других покоящихся форм	наружных слоев клетки, состав	запасных веществ, состав			
<i>Bacillus thuringiensis</i>								
<i>Lactococcus lactis</i>								
<i>Lactobacillus lactis</i>								
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>								
<i>Rhizobium meliloti</i>								
<i>Azotobacter vinelandii</i>								
<i>Saccharomyces cerevisia</i>								
*								
*								

Примечание: строки, обозначенные значком «*», заполнить, используя характеристики и свойства любых других видов бактерий.

5. Используя полученные результаты и данные литературы, заполните табл. 4.

8. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Получение накопительной культуры

Выделение культур микроорганизмов будет успешным, если обеспечить содержание их клеток в популяции в высокой концентрации. Накопление представляет собой основной этап процесса выделения, который позволяет получить чистые культуры. Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества клеток определенной физиологической группы или данного вида микроорганизмов за счет создания благоприятных условий для их роста и выживания по сравнению с другими. Получение накопительной культуры предполагает создание селективных условий, что обеспечивается подбором соответствующих сред или использованием влияния различных факторов окружающей среды.

О развитии накопительной культуры судят по появлению характерных признаков роста культуры: помутнению среды, образованию пленки, осадка, выделению газов, развитию пигментации. Помимо этого можно провести микроскопирование культуры и выявить наличие желаемых форм.

Накопление дает возможность оценить воздействие различных факторов окружающей среды на смешанную популяцию микроорганизмов, благодаря чему может происходить отбор клеток, способных утилизировать необычные субстраты или хорошо расти в необычных условиях.

К физическим методам, которые могут быть использованы при получении накопительной культуры, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение и др. Можно использовать также другие особенности клеток микроорганизма, например размеры, подвижность, что позволяет выделить данный микроорганизм среди других членов популяции. В качестве примеров использования характерных признаков бактерий приведем следующие.

Получение накопительной культуры бактерий, обладающих скольльзящим типом движения. Пробы предварительно разведенного исследуемого биологического материала засевают петлей в конденсационную жидкость скошенной агаризованной питательной среды в пробирках. Посевы инкубируют при оптимальной температуре. Клетки, характеризующиеся скольльзящим типом движения, распределяются по поверхности среды и разрастаются далеко за зону нанесения посевного материала.

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

Инкубирование при низкой температуре для получения культур психрофильных бактерий. На первом этапе проводят инкубирование образцов природного материала при низких температурах (0–5 °С), поскольку в этих условиях задерживается рост многих бактерий. Инкубирование при температуре ниже –5 °С осуществляют в течение 14–24 суток.

При использовании **химических методов** применяют химические вещества, которые убивают или подавляют рост части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, можно использовать вещества, которые служат источниками питания преимущественно для отдельных микроорганизмов в смешанной популяции. Примерами применения таких методических подходов для выделения микроорганизмов являются следующие.

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

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

Разбавленная среда для получения культур Sphaerotilus. Бактерии данного рода, образующие чехлы, встречаются в загрязненных сточных водах, открытых водоемах, где формируют слизистые «пряжи», прикрепленные к погруженным в воду предметам. Процедура получения накопительных культур основана на их способности к росту при низком содержании питательных веществ. В питательную среду, содержащую источник углерода в концентрации до 100 мг/л, добавляют пробы воды. В течение 2–5 суток инкубирования проводят микроскопический контроль за образованием нитей. Для получения чистой культуры проводят рассев пленки на твердую среду.

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

Бактериальные клетки как субстрат для роста миксобактерий. Некоторые виды миксобактерий способны с помощью литических фермен-

тов лизировать клетки других бактерий и использовать высвобождающиеся при этом вещества для своего роста. Бактериальные клетки, используемые в качестве субстрата (например, представители семейства *Enterobacteriaceae*), в виде густой суспензии наносят мазком на поверхность водно-агаровой среды. На один конец мазка помещают две-три частицы почвы или кусочки растительного материала. Через 2–5 суток исследуют чашки и анализируют растворение бактериального мазка вокруг добавленных частиц. При обнаружении по его краям желтых, оранжевых или розовых плодовых тел их переносят на питательную среду.

Биологические методы включают использование специфических хозяев выделяемого микроорганизма, а также преимуществ некоторых свойств патогенных микроорганизмов. В качестве примеров можно рассмотреть следующие.

Получение накопительной культуры патогенных для животных микроорганизмов. Патогенные для животных бактерии можно выделить, заражая восприимчивое животное-хозяина смешанной культурой исследуемого материала, в котором предполагается их присутствие. В инфицированном организме патогенные формы часто преобладают и обнаруживаются в крови и тканях в виде чистой культуры. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется и они гибнут. Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4–6 ч после внутрибрюшинного введения мышам смеси эмульгированной мокроты, содержащей *Streptococcus pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перитонеальной жидкости отбирают из брюшинной полости животного с помощью стерильной пипетки или шприца.

Бактериальный паразитизм бделловибрионов. Способность бделловибрионов прикрепляться к различным грамотрицательным бактериям, проникать через их клеточную стенку и размножаться в периплазматическом пространстве с последующим лизисом клеток используется следующим образом. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования растворенной в воде почвы, пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор до 0,45 мкм. Полученный фильтрат смешивают с суспензией клеток-хозяев (представители семейств *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*). В составе полужидкой питательной среды смесь настилают на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. После инкубирования в течение 18–24 ч проверяют появление зон лизиса. Области лизиса, образованные бделловибрионами (в отличие от бактериофагов), появляются через 2–3 суток. Образующиеся зоны лизиса вырезают из агара и повторно настилают на газон чувствительной культуры.

*Симбиоз растений с бактериями рода *Rhizobium*.* Клубеньки, появляющиеся на корнях бобовых растений, представляют собой природную

накопительную культуру симбиотических азотфиксирующих бактерий. Корни бобовых растений, содержащие клубеньки, промывают и отделяют часть корня с клубеньками. После поверхностной стерилизации (с использованием сулемы, этанола) корень помещают в стерильную воду и стерильным пинцетом раздавливают в чашке Петри, одну-две петли такой суспензии переносят в следующую чашку и т. д. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный агар с маннитом. После его застывания чашки инкубируют при оптимальной температуре.

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

Собственно выделение чистой культуры

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

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

Рассев шпателем (метод Коха) производят в следующей последовательности:

- на поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем;
- чашку быстро закрывают и переносят шпатель в чашку № 2, не стерилизуя его. Имитируют распределение культуры по всей поверхности среды, прикасаясь к ее поверхности той же стороной шпателя, которой ранее распределяли пробу;

- точно те же действия проводят и в чашке № 3, после чего шпатель стерилизуют;

- засеянные чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы образующаяся конденсационная жидкость не мешала формированию изолированных колоний, и инкубируют при оптимальной температуре.

Через определенное время (от 1 до 7 суток) чашки достают из термостата и изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдается сплошной рост бактерий, в последующих чашках формируются изолированные колонии. Такие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенного агара или в жидкую среду для последующего анализа.

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает высев бактериологической петлей из жидкой накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри (рис. 3). На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованную среду (см. рис. 3, а). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым штрихам (см. рис. 3, б). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении в (см. рис. 3, в), а после очередной стерилизации – в направлении г (см. рис. 3, г).

Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах а и б вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах в и г формируются изолированные колонии.

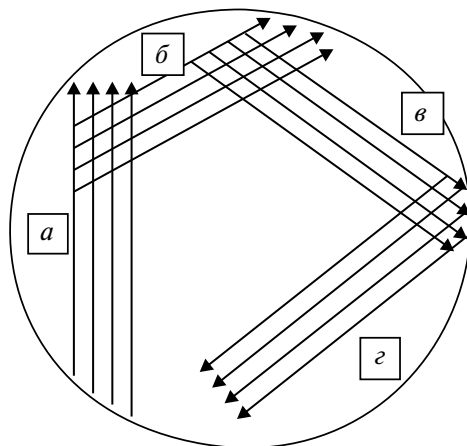


Рис. 3. Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Последовательные разведения в твердой среде – один из простых способов посева, который заключается в том, что после инокуляции пробы в пробирку со стерильным расплавленным и охлажденным до 45 °С агаром среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают смеси застыть. Для получения изолированных колоний готовят ряд последовательных десятикратных разведений накопительной культуры и из каждого разведения по 0,5–1,0 мл проб вносят сразу в чашку, добавляют 15–20 мл расплавленной агаризованной среды и перемешивают, покачивая ее. Иногда отдельные колонии оказываются погруженными в агар и извлечь их можно только механически. Следует учитывать и то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара.

Использование данного метода целесообразно для изолирования аэробных, микроаэрофильных или факультативно-анаэробных видов. Для получения чистой культуры бактерий иногда бывает достаточно одного посева на плотную среду, однако чаще эту процедуру проводят 2–3 раза, а в качестве посевного материала используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Определение чистоты выделенной культуры

Выросшие изолированные колонии отсевают бактериологической петлей на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирке.

Поскольку изолированные колонии иногда могут формироваться не только из отдельных клеток, обязательным этапом выделения чистой культуры должна быть проверка их однородности. Это осуществляется несколькими способами: визуальным и микроскопическим контролем, а также высевом на соответствующие питательные среды. При **визуальном контроле** исследуют рост культуры по штриху на поверхности скошенной среды; в том случае, если рост неоднороден, считают, что культура загрязнена и требуется ее дополнительная расчистка.

Чистоту выделенных культур микроорганизмов обязательно нужно подвергать **микроскопическому контролю**. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток, который микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки чистых культур микроорганизмов, как правило, однородны по размеру и окраске по Граму. Однако следует помнить, что в чистых культурах многих бактерий могут появляться различающиеся по морфологии клетки, цисты, споры. Наконец, многие микроорганизмы проявляют свойство грамвариабельности, т. е. после прекращения активного роста могут терять способность окрашиваться по Граму.

Чистоту культур клеток проверяют также путем повторного **высева на соответствующие питательные среды**. Критерием чистоты в этом случае является однородность формирующихся колоний. Дополнительно в чи-

стоте культуры можно убедиться и при *рассеве клеток на селективные среды*, обеспечивающие избирательный рост тех или иных микроорганизмов.

Скопление клеток одного вида, выросшее из одной клетки, называют *колонией*. На некоторые особенности и характеристики колоний могут влиять состав среды выращивания, возраст культуры, условия культивирования.

При описании колоний, которые образуются на поверхности плотной питательной среды (рис. 4–7), учитывают следующие их признаки:

- диаметр (размер) в миллиметрах;
- цвет или пигментацию, выделение пигмента в субстрат;
- форму (точечная, округлая, неправильная, ризоидная и т. д.);
- высоту, профиль (плоский, высокий, выпуклый, кратерообразный и т. д.);
- вид края (ровный, волнистый, лопастной, зубчатый, бахромчатый) и т. д. Для рассмотрения краев используют микроскоп с малым увеличением;
- поверхность (гладкая, шероховатая, неровная, гранулированная, исчерченная и т. д.);
- блеск и прозрачность колонии (прозрачная, блестящая, полупрозрачная, матовая, тусклая, непрозрачная и т. д.);
- консистенцию (определяют при прикосновении петлей: она может быть мукоидной (слизистой), маслянистой, вязкой, тянущейся, сухой и т. д.);
- структуру (крупно- или мелкозернистая, однородная, волокнистая и т. д.).

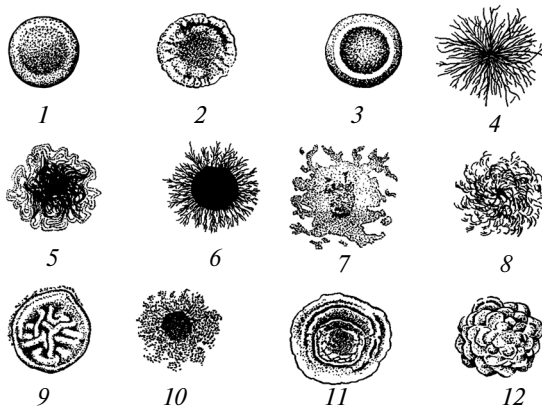


Рис. 4. Формы бактериальных колоний:

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

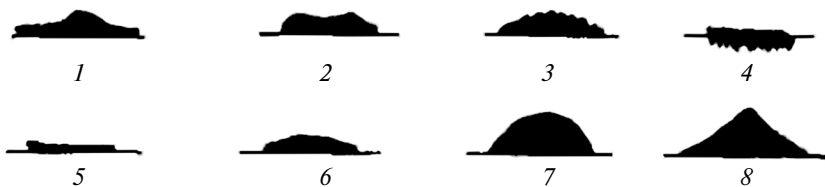


Рис. 5. Профиль бактериальных колоний:

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

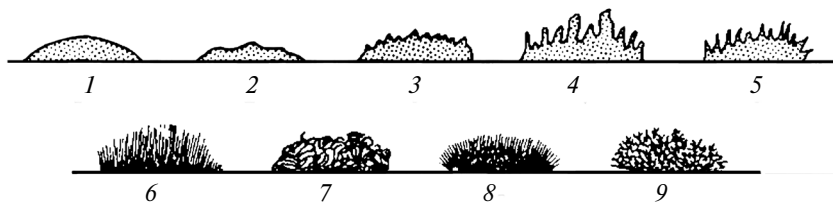


Рис. 6. Характер края бактериальных колоний:

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

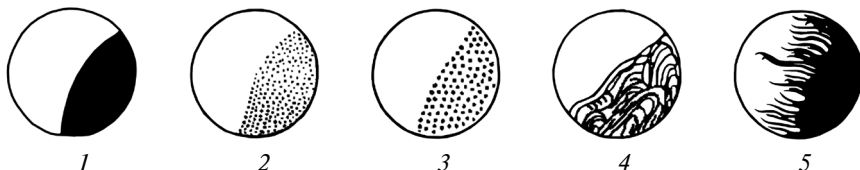


Рис. 7. Структура бактериальных колоний:

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

Выделяют также колонии *глубинные*, формирующиеся в толще агаризованной среды, и *донные*, образование которых наблюдается на дне чашек Петри под слоем агаризованной среды в виде тонких стелющихся пленок.

Задания

1. Проведите рассев накопительной культуры на агаризованные питательные среды в чашках Петри методами Коха и истощающего штриха.

2. Опишите морфологические особенности трех – пяти изолированных колоний. Результаты оформите в виде таблицы.

3. Отсейте одну из охарактеризованных колоний на скошенный агар для последующего определения некоторых ее физиолого-биохимических свойств.

9. ПРИНЦИПЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

Определение родовой и видовой принадлежности микроорганизмов основывается на результатах морфологических, физиологических, биохимических и молекулярно-биологических тестов. Кроме того, для идентификации некоторых видов микроорганизмов исследуют химический состав и строение клеточной стенки, серологические свойства, чувствительность к фагам и другие особенности клеток. В последние годы благодаря достижениям генетики и молекулярной биологии стало возможным применение новых подходов для идентификации и классификации бактерий. Проведение генетических скрещиваний, картирование хромосом микроорганизмов, знание нуклеотидного состава ДНК и 16S р-РНК, данные по гибридизации нуклеиновых кислот позволяют судить о филогенетической близости отдельных видов.

В систематике бактерий можно выделить три взаимосвязанных аспекта: 1) **классификацию** – распределение по группам бактерий со сходными фенотипическими, серологическими или генетическими характеристиками; 2) **номенклатуру** – наименование бактерий в соответствии с международными принципами, правилами и рекомендациями; 3) **идентификацию** – установление принадлежности микроорганизмов к определенному таксону на основании наличия конкретных признаков. Следовательно, систематика стремится расположить множество бактериальных видов в последовательной, ясной и удобной для использования форме.

Основной единицей в систематике является **вид**. В микробиологии под видом обычно понимают типовой штамм и все остальные штаммы, считающиеся достаточно сходными с типовым штаммом. **Типовой штамм** – это штамм, выбранный в качестве постоянного образца того, что подразумевается под данным видом. Культуры типовых штаммов находятся в разных коллекциях (например, американская коллекция типовых культур, коллекция культур Института микробиологии НАН Беларуси, коллекция микроорганизмов Белорусского государственного университета и т. д.).

Исторически сложившийся способ характеристики бактерий заключается в описании как можно большего числа фенотипических признаков, основанных на данных морфологии, структуры клетки, особенностей культивирования, питания, биохимии, метаболизма, патогенных и антигенных свойств и экологических характеристик.

В настоящее время в микробиологии существуют две системы классификации бактерий: *филогенетическая* (объективно отражает родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития) и *искусственная* (преследует в первую очередь практические цели, заключающиеся в быстром установлении принадлежности микроорганизма к определенному таксону). Наиболее популярная и широко применяемая – искусственная классификация, приведенная в «Определителе бактерий Берги». Первое издание его вышло в свет в 1923 г., последнее (9-е), русскоязычное – в 1997 г. Описание бактерий приводится по группам (35), в состав которых включены семейства, роды и виды. Патогенные и условно-патогенные для человека виды входят в достаточно небольшое число групп (около 20).

При идентификации микроорганизмов необходимо придерживаться следующих правил:

- быть уверенным в чистоте выделенной культуры;
- постановку тестов по изучению морфологических и физиолого-биохимических особенностей проводить не менее чем в двукратной повторности;
- обязательно делать заведомо положительный и заведомо отрицательный контроль.

Исследователь должен выяснить, является ли микроорганизм фототрофным, хемоавтотрофным или хемогетеротрофным. Необходимо также знать, является ли он аэробом, анаэробом, микроаэрофилом или факультативным анаэробом, а также определить некоторые морфологические свойства: окраску по Граму, форму клеток, специфические признаки (наличие спор, капсул и т. д.). Весьма важными являются три физиологических теста: 1) на наличие каталазы, 2) наличие оксидазы, 3) способности к аэробному или анаэробному катаболизму углеводов. Идентификацию микроорганизма облегчают знания об особых физиологических свойствах, присущих данному виду.

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание способности расти на различных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в их состав. Чаще всего учитывают природу источника углерода и энергии, форму азотсодержащих соединений, отношение к кислороду, ферментативную активность при выращивании в присутствии раз-

личных субстратов. В настоящее время разработано множество методических подходов и приемов для определения того или иного свойства бактерий, различающихся сложностью постановки. В данном пособии приведены некоторые наиболее простые тесты, используемые для исследования физиолого-биохимических свойств бактерий.

Выявление окислительно-восстановительных ферментов

Выявление каталазы проводят на предметном стекле в капле 3 %-ного раствора перекиси водорода. Стерильной бактериологической петлей в каплю перекиси вносят исследуемую культуру и тщательно перемешивают. При наличии каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

Выявление оксидазы также проводят на предметном стекле. Бактериальную культуру снимают с агаризованной среды и вносят в каплю 1 %-ного раствора дигидрохлорида тетраметил-*n*-фенилендиамина. При положительной реакции в течение 1 мин развивается розово-красная окраска. Положительный результат – *Pseudomonas putida*; отрицательный – *Escherichia coli*.

Для **выявления дегидрогеназ** в пробирку вносят 1 мл суспензии бактерий, добавляют 0,5 мл 3 %-ного раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ). Смесь помещают в термостат на 30 мин. Если дегидрогеназы восстанавливают ТТХ до формазана, то развивается красное окрашивание трифенилформазана. Положительный результат – *Pseudomonas putida*; отрицательный – *Lactococcus lactis*.

Определение нитратредуктазы проводят с использованием реактива Грисса. К 1–2 мл исследуемой суспензии прибавляют 0,1 мл 10 %-ного раствора азотнокислого натрия или калия. Пробирки с пробами инкубируют в течение 1 ч при 37 °С. После этого в пробирку вносят 1 мл реактива Грисса. Сразу же после внесения реактива учитывают результат. Если бактериальная культура образует нитратредуктазу, то среда окрашивается в вишнево-красный цвет. В случае отрицательного результата цвет среды не изменяется. Положительный результат – *Proteus vulgaris*; отрицательный – *Escherichia coli*.

Окислительное (ферментативное) сбраживание углеводов (O/F тест) определяют следующим образом. В две пробирки с полужидкой средой, содержащей углеводы (глюкозу) и индикатор, с помощью бактериологической петли вносят исследуемую культуру. Затем столбик агара в одной из пробирок покрывают слоем (около 1 см) стерильного вазелинового масла («анаэробная пробирка»). Культура в другой пробирке

остаётся в неизменном виде («аэробная пробирка»). Пробирки инкубируют в течение 24–48 ч.

Полученные результаты интерпретируют следующим образом. Если изменение окраски среды происходит только в «аэробной пробирке», то клетки катаболизируют углевод только в присутствии кислорода (окисление углевода, реакция «О»). Если подкисление среды и изменение ее окраски наблюдаются в обеих пробирках, то клетки способны также к брожению (ферментативное сбраживание, реакция «F»). Положительный результат — *Pseudomonas putida*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Определение продукции гидролитических ферментов

Многие микроорганизмы в качестве питательных субстратов способны использовать различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Однако макромолекулы этих соединений не могут проникать через цитоплазматическую мембрану и не используются микроорганизмами. Первоначально под действием гидролитических ферментов, которые выделяются микроорганизмами из клеток, субстраты расщепляются до низкомолекулярных продуктов, которые затем с участием специализированных транспортных систем поступают в бактериальные клетки.

Для выявления гидролитической способности микроорганизмов в лабораторной практике используются специальные методы, суть которых заключается в следующем. Микроорганизмы выращивают на питательной среде, которая содержит макромолекулярное соединение. Если клетки синтезируют экзоферменты, гидролизующие этот субстрат, то вокруг колоний образуется зона продуктов гидролиза.

Определение протеолитической активности заключается в выявлении протеаз, которые катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Активность последних определяют, используя в качестве субстратов желатин, казеин и другие белки.

Разжижение желатина. С помощью бактериологической петли биомассу исследуемого микроорганизма засевают уколом в питательный мясопептонный желатин, приготовленный следующим образом: к жидкой полноценной среде добавляют сухой желатин (12 %), размачивают до набухания, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатина и разливают в пробирки по 5–8 мл. Пробирки стерилизуют при 0,5 атм 15 мин. Посев производят после застывания столбиков, и микроорганизмы инкубируют при оптимальной температуре 24–72 ч.

Разжижение желатина регистрируют визуально; при этом отмечают интенсивность и характер разжижения, которое может быть послойным, мешковидным, пузыристым, в виде ели, повернутой верхушкой вниз, и т. д.

О наличии протеолитических ферментов может свидетельствовать и *гидролиз казеина*. В этом случае обезжиренное (0,3–0,5 %) молоко смешивают с питательной средой и определяют образование сгустков и осадка после инкубирования с исследуемыми микроорганизмами.

Определение амилолитической активности заключается в посеве микроорганизмов на поверхность полноценной питательной среды, которая содержит 0,2 % растворимого крахмала. Через 3–5 суток инкубирования на поверхность среды в чашках Петри наносят раствор Люголя. При отрицательной реакции поверхность остается синей. Если бактерии гидролизуют крахмал, то питательная среда не окрашивается.

Утилизация микроорганизмами источников углерода

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать для поддержания своей жизнедеятельности различные источники углерода. Для выяснения возможности развития микроорганизма за счет тех или иных углеродсодержащих веществ испытываемые культуры высевают на среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. Из углеводов и многоатомных спиртов испытывают, как правило, следующие соединения: глюкозу, фруктозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, глицерин, маннит и др.

Для определения способности микроорганизмов использовать углеводы и спирты применяют агаризованные синтетические среды или дифференциально-диагностические среды Гисса.

Определение способности микроорганизмов использовать углеводы и спирты на средах Гисса. В состав сред Гисса входят:

- основной фон (в %, пептон – 0,5; K_2HPO_4 – 0,1);
- индикатор (бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, феноловый красный);
- исследуемый углевод или спирт (1 %).

Среды Гисса могут быть использованы в жидком или полужидком состоянии. В последнем случае к среде добавляют 0,5 % агара.

Рост микроорганизмов на средах с углеводами или спиртами может приводить к накоплению органических кислот, нейтральных продуктов и газов. Образование кислот регистрируется по изменению pH среды, о чем свидетельствует изменение окраски индикатора. Образование газа определяют по появлению на поверхности среды пены или разрывов и пузырьков в толще среды.

С помощью бактериологической петли испытуемый микроорганизм уколом засевают в среду Гисса в пробирках. Инкубируют в течение 2–4 суток при оптимальной температуре. Рост бактерий в полужидкой среде отмечают в месте укола или на поверхности, также регистрируют образование газа и органических кислот. Полученные результаты сравнивают с характером роста в контрольной (фоновой) среде, не содержащей испытуемого соединения.

Определение способности микроорганизмов использовать углеводы на агаризованных синтетических средах. На поверхность агаризованной среды с углеводом или спиртом в чашке Петри с помощью петли засевают штрихом испытуемые микроорганизмы. Чашки инкубируют при оптимальной для роста температуре. Результаты учитывают по наличию роста культур в сравнении с ростом на контрольной чашке, не содержащей испытуемых соединений.

Данный метод удобен тем, что позволяет одновременно проверить способность нескольких микроорганизмов использовать тот или иной источник углерода. В этом случае дно чашки Петри с наружной стороны разделяют маркером на отдельные сектора. Затем каждую из исследуемых культур микроорганизмов засевают петлей на отдельный сектор.

Утилизация микроорганизмами органических азотсодержащих веществ

Большинство гетеротрофных микроорганизмов могут усваивать азот органических соединений (белков, пептонов и др.). В процессе ферментативного гидролиза белка выделяются аминокислоты или газообразные продукты, которые используются клеткой при анаболизме, а также подвергаются расщеплению в результате аэробного окисления или брожения до более простых соединений с запасанием энергии. В конечном итоге разложение белков микроорганизмами сопровождается выделением следующих побочных продуктов:

- аммиака – при дезаминировании аминокислот;
- сероводорода – при использовании серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин);
- индола – при утилизации триптофана.

Обнаружение подобных продуктов свидетельствует об использовании вышеперечисленных соединений.

Определение *образования индола* может быть проведено несколькими способами. Общий принцип заключается в его определении как одного из промежуточных продуктов разложения триптофана. После выращивания бактерий в течение пяти суток в жидкой полноценной среде, содержащей 0,01 % триптофана, на ее поверхность наслаивают

1–2 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензальдегид, растворенный в этаноле и соляной кислоте). При положительной реакции на границе раздела со средой образуется красное кольцо.

В качестве индикатора могут выступать и фильтровальные бумажки, пропитанные насыщенным раствором щавелевой кислоты, которые помещают под пробку и которые изменяют цвет (от розового до красного) при образовании индола.

Определение *образования сероводорода* также проводят с использованием индикаторных бумажек, пропитанных раствором уксуснокислого свинца. После засева и соответствующего инкубирования исследуемых культур в жидкой полноценной питательной среде отмечают почернение бумаги, которое свидетельствует об образовании сульфида свинца вследствие выделения сероводорода.

Образование аммиака определяют после культивирования бактерий в жидкой полноценной питательной среде в присутствии индикаторной бумажки, пропитанной реактивом Крупа. Об образовании аммиака свидетельствует покраснение бумаги.

После постановки всех тестов результаты следует занести в табл. 5.

Таблица 5

Морфологические и физиолого-биохимические особенности бактерий

Тест или свойство	Результат
Морфология колоний	
Грампринадлежность	
Наличие окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов:	
каталазы	
оксидазы	
дегидрогеназ	
протеаз	
амилаз	
Использование азотсодержащих органических соединений:	
образование сероводорода	
образование аммиака	
образование индола	
Использование органических источников углерода (рост на среде Гисса) с:	
глюкозой	
лактозой	
сахарозой	
мальтозой	
маннитом	

Примечание: «+» или «-» – положительная или отрицательная реакция; «К» – образование кислоты; «Г» – выделение газообразных продуктов при сбраживании углеводов и спиртов.

Задания

1. Проведите визуальный и микроскопический контроль отсеянной ранее культуры бактерий.
2. Определите грампринадлежность выделенной культуры экспресс-методом.
3. Проведите постановку следующих физиолого-биохимических тестов и выявите наличие каталазной, протеолитической, амилитической, сахаролитической активности, а также образование сероводорода, аммиака, индола.
4. Результаты экспериментов представьте в виде табл. 5.
5. Сравните (на основании данных литературы) морфологические и физиолого-биохимические особенности четырех-пяти представителей различных родов бактерий.

10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или на различных типах питательных сред судят по количеству клеток в единице объема. Данная величина носит название **титр клеток**. Выбор метода для его определения зависит от цели исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также от особенностей роста, морфологии клеток и колоний микроорганизмов. Существуют методы, позволяющие определять общее количество или только количество жизнеспособных клеток микроорганизмов в исследуемом материале. Методы подсчета могут быть разделены также на методы прямого подсчета (микроскопические), методы подсчета колоний (методы посева) и методы оптические (нефелометрия, спектрофотометрия и т. д.). Не следует исключать и возможность оценки количества клеток на основании таких показателей, как биомасса, содержание белка и др.

Для определения *общего количества клеток микроорганизмов* в различных материалах применяют методы прямого их подсчета под микроскопом (в специальных счетных камерах, в фиксированных мазках, на мембранных фильтрах). Эти методы широко применяются в исследованиях микробиоты воды, почвы и других образцов. Эффективность здесь, как правило, в 10–10 000 раз выше, чем при подсчете методом посева, так как многие микроорганизмы не растут на питательных средах и учесть их можно только под микроскопом. Эти методы дают возможность получить дополнительную информацию о размерах и морфологии изучаемого объекта. Кроме того, прямой подсчет микроорганизмов

производится в более короткие сроки, более дешево, оборудование для его осуществления имеется практически в каждой лаборатории. Основное ограничение данных методов – содержание относительно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетной камере

Данный метод рекомендуется для подсчета клеток крупных размеров – дрожжей, водорослей, крупных бактерий. В этих целях используется камера Горяева – Тома. Она представляет собой толстое предметное стекло, в центральной части которого нанесена сетка. Глубина такой камеры (0,1 мм), площадь больших и малых квадратов сетки составляют соответственно 1/25 и 1/400 мм². При работе с камерой углубление с сеткой покрывают специальным покровным стеклом и, слегка прижимая, двигают в противоположные стороны. Предварительно камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Подготовленную камеру помещают на столик микроскопа.

Число клеток можно подсчитывать при увеличении объектива ×10 или ×40. Обычно подсчет проводят в 10 больших или 20 малых квадратах, количество клеток в которых не должно превышать 20 или 10. Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исследуемой суспензии, вычисляют по формуле

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

где M – количество клеток в 1 мл суспензии; A – среднее число клеток в квадрате сетки; S – площадь квадрата сетки, мм²; h – глубина камеры; 10^3 – коэффициент перевода см³, мм³; n – разведение исследуемой суспензии.

Подсчет клеток в окрашенных препаратах (метод Виноградского – Брида)

Преимущество метода заключается в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются и подсчет можно проводить в удобное для исследователя время. Метод используется в различных модификациях для определения числа клеток микроорганизмов в природных субстратах – почве, загрязненной воде, средах, содержащих неразстворимые компоненты, и т. п.

Техника:

1. На хорошо обезжиренном предметном стекле маркером рисуют прямоугольник строго известной площади (2, 4 или 6 см²).

2. На стекло в прямоугольник микропипеткой (или автоматической пипеткой) наносят определенный объем суспензии клеток (0,01; 0,02 или 0,03 мл).

3. Суспензию равномерно распределяют стерильной бактериологической петлей по всей площади прямоугольника.

4. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют 15 мин 96 %-ным этанолом.

5. Проводят окрашивание фуксином Циля 1–2 мин.

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, последовательно погружая стекло в 5–6 стаканов с водой, и высушивают на воздухе.

Количество клеток микроорганизмов подсчитывают, используя иммерсионный объектив, в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Площадь квадрата сетки или поля зрения определяют с помощью объект-микрометра. Последний помещают на столик микроскопа вместо препарата и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют длину стороны квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения.

Для получения достоверных результатов клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать не менее чем в 50–100 полях зрения, а общее количество подсчитанных клеток должно быть не менее 600. Количество клеток микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исследуемой суспензии, вычисляют по формуле

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

где M – количество клеток в 1 мл исходной суспензии; A – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); s и S – площадь квадрата окулярной сетки и приготовленного мазка соответственно, мкм^2 ; V – объем нанесенной на стекло суспензии, мл; n – разведение исследуемой суспензии.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах

Этот метод используют для подсчета количества микроорганизмов в жидких материалах с низкой плотностью клеток. В основе метода – концентрирование клеток на поверхности фильтра в результате фильтрации определенного объема исследуемой пробы с последующим окрашиванием клеток и их подсчетом в микроскопе. Для фильтрации выбирают фильтр с диаметром пор, позволяющим задерживать все клетки, находящиеся в исследуемом материале.

С помощью мембранного фильтрования можно подсчитать жизнеспособные клетки микроорганизмов, а также определить общее количество клеток. Начальным этапом данной работы являются приготовление фильтров, прибора для фильтрования и собственно фильтрование.

Техника:

1. Прибор для фильтрования собирают под вакуумом. Для этого основание стерильного фильтродержателя вставляют в стерильную колбу Бунзена, с помощью стерильного пинцета (пинцет окунают в спирт и обжигают) в фильтродержатель помещают стерильный фильтр (стерилизуют кипячением) и закрепляют зажимом. Отводной конец колбы Бунзена соединяют с вакуумным насосом.

2. Строго определенный объем исследуемого материала пропускают через мембранный фильтр, создавая с помощью насоса вакуум.

3. Фильтр с осевшими клетками микроорганизмов снимают стерильным пинцетом и исследуют в зависимости от целей эксперимента.

При подсчете *общего количества клеток микроорганизмов* проводят окрашивание фильтра 5 %-ным раствором карболового эритрозина. Для этого фильтр помещают нижней стороной в чашку Петри на фильтровальную бумагу, насыщенную красителем, чашку закрывают и оставляют на 30–60 мин. Фильтр отмывают от красителя, последовательно перенося его в чашки Петри с фильтровальной бумагой, насыщенной дистиллированной водой, до тех пор, пока он не перестанет окрашивать влажную фильтровальную бумагу. Фильтр высушивают на воздухе и готовят препарат для микроскопирования следующим образом. На предметное стекло накапывают иммерсионное масло и помещают на него окрашенный мембранный фильтр таким образом, чтобы клетки микроорганизмов были сверху. На поверхность фильтра наносят еще каплю иммерсионного масла и накрывают фильтр покровным стеклом.

Количество клеток микроорганизмов подсчитывают, используя иммерсионный объектив $\times 90$ в квадратах окулярной сетки или в поле зрения микроскопа. Правила подсчета аналогичны тем, которых придерживаются для метода Виноградского – Брида. Количество клеток в 1 мл исследуемого материала определяют по следующей формуле:

$$M = \frac{a \times F \times 10^6}{V \times s},$$

где M – количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии; a – среднее число клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); s и F – площадь квадрата окулярной сетки и мембранного фильтра соответственно, мм^2 ; V – объем профильтрованной суспензии, мл; 10^6 – коэффициент перевода мм^2 в мкм^2 .

При определении *количества жизнеспособных клеток микроорганизмов* с помощью мембранных фильтров исходят из того, что если фильтр с находящимися на его поверхности микроорганизмами поместить на агаризованную питательную среду, то питательные вещества, проникая через поры фильтра, обеспечивают возможность формирования колоний, различимых невооруженным глазом. Подсчитав колонии, выросшие на поверхности фильтра после соответствующего инкубирования, определяют количество жизнеспособных клеток микроорганизмов, которые были им задержаны. Этот метод аналогичен методу подсчета клеток на чашках, но является более чувствительным, поскольку через фильтр можно пропускать практически неограниченные объемы исследуемого материала. Во многих случаях из-за низкой плотности микроорганизмов в жидких средах обычный подсчет на чашках невозможен.

Техника:

После проведения фильтрования с соблюдением стерильности мембранный фильтр снимают стерильным пинцетом и помещают на поверхность 1,5 %-ной агаризованной среды в чашке Петри. Следят за тем, чтобы между фильтром и средой не образовывалось пузырьков воздуха. Чашку помещают в термостат и инкубируют при оптимальной для микроорганизмов температуре. При подсчете колоний для увеличения контрастности мембранный фильтр с колониями окрашивают. Для этого поверхность фильтра, находящегося в чашке Петри, заливают 0,01 %-ным водным раствором оксалата малахитового, который через 8–10 с сливают. При этом способе окрашивания колонии выглядят белыми или желтыми на фоне зеленого фильтра. Рассчитывают количество жизнеспособных клеток в 1 мл исследуемого материала.

Подсчет *клеток микроорганизмов на мембранных фильтрах* можно также осуществлять с использованием *люминесцентного микроскопа*. Метод заключается в концентрировании бактерий из исследуемого материала на нелюминесцирующий мембранный фильтр, флуорохромировании акридиновым оранжевым и подсчете клеток в специальном (люминесцентном) микроскопе. Этот метод удобен тем, что позволяет непосредственно подсчитать как общее количество клеток, так и количество жизнеспособных клеток. При окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные клетки имеют зеленую, а нежизнеспособные (мертвые) — красную окраску.

Техника:

Мембранный фильтр с бактериями помещают в чашку Петри на фильтровальную бумагу, насыщенную 0,05 %-ным раствором акридинового оранжевого в фосфатном буфере (рН 6,0). Окрашивание проводят 15–20 мин. Фильтр промывают, последовательно перенося

в чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой. После высушивания готовят препарат для микроскопирования: на предметное стекло наносят нелюминесцирующее вазелиновое масло и помещают на него фильтр так, чтобы бактерии были сверху. На поверхность фильтра наносят еще каплю масла и покрывают тонким покровным стеклом. Препарат микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Подсчитывают живые и мертвые клетки в 20 случайно выбранных полях зрения и количество клеток в 1 мл исследуемого материала, используя формулу, приведенную выше в методике для подсчета клеток на мембранных фильтрах.

Определение количества микробных клеток с использованием агаризованных питательных подложек

Питательные агаризованные подложки изготавливают в форме, готовой к употреблению для микробиологического анализа разных образцов. В сочетании с методом мембранной фильтрации они являются быстрым, точным и эффективным способом контроля содержания микробных клеток в сырье или готовой продукции. Питательные подложки представляют собой изготовленные из сорбирующего материала диски (диаметром 40–50 мм), на которые нанесена стерильная питательная агаризованная среда. После фильтрования мембранные фильтры с находящимися на них клетками помещают на подложки и инкубируют при оптимальной температуре. После этого подсчитывают количество сформировавшихся колоний и определяют титр клеток, используя ту же формулу, что и для подсчета клеток на мембранных фильтрах.

Определение количества микробных клеток нефелометрическим методом

Этот метод широко используется в микробиологических исследованиях, так как позволяет достаточно точно и сравнительно быстро определить количество клеток в культуральной среде. В основе его лежит измерение количества света, рассеянного взвесью клеток. Микроорганизмы в большинстве случаев не окрашены и почти прозрачны, поэтому суспензии клеток в видимой области спектра поглощают свет незначительно. Уменьшение интенсивности света после его прохождения через взвесь клеток связано главным образом с его рассеиванием, в определенных пределах пропорциональным их численности. Обычно используют световой поток с длиной волны 540–650 нм. При

постоянной длине волны падающего света светорассеяние зависит от размеров клеток и будет тем большим, чем крупнее клетки. Применение нефелометрического метода целесообразно для тех культур микроорганизмов, развитие которых вызывает равномерное помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клетки, образованием мицелия, пленок и других скоплений.

Величину светорассеяния измеряют с помощью нефелометров, спектрофотометров или фотоэлектроколориметров. В этих приборах измеряется первичный пучок света, который проходит через пробу и, не отклоняясь, падает на фотоэлемент. Обычно при этом сравнивается интенсивность света, проходящего через суспензию клеток и через среду без клеток. Для измерения светорассеяния выбирают светофильтр, обеспечивающий максимум пропускания света данной взвесью. Питательная среда для культивирования микроорганизмов, в которой предполагается определять количество клеток по рассеиванию, должна быть оптически прозрачной.

Количество клеток определяют по *калибровочной кривой*, отображающей зависимость между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема исследуемой взвеси. Для построения калибровочной кривой измеряют величину светорассеяния взвеси в пробах с разным содержанием клеток и в каждой из них одним из доступных способов подсчитывают количество клеток в единице объема. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси абсцисс показания нефелометра, на оси ординат – количество клеток, содержащихся в 1 мл. Калибровочные кривые индивидуальны как для каждой культуры, так и для определенных условий ее выращивания (состав среды, температура, аэрация и т. д.).

В некоторых случаях количество клеток в суспензии может быть определено путем сравнения со **стандартом мутности**. Стандарты мутности представляют собой взвесь частиц некоторых солей в дистиллированной воде. За единицу стандарта мутности условно принята мутность суспензии тифозных бактерий с концентрацией 100 млн/мл. Такой стандарт включает четыре эталона, соответствующих 11, 10, 9 и 5 единицам или $1,1 \cdot 10^9$, $1,0 \cdot 10^9$, $0,9 \cdot 10^9$, $0,5 \cdot 10^9$ кл/мл. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают на фоне листа белой бумаги, в центре которой нанесено несколько черных линий. Другие эталоны используют как вспомогательные, позволяющие более четко определить мутность исследуемой культуры. Такой метод определения количества клеток имеет существенное значение в процессе приготовления посевного материала, например для определения антибиотической активности, чувствительности к антибиотикам и в ряде других случаев.

Определение количества жизнеспособных клеток путем посева на питательные среды (чашечный метод Коха)

Сущность метода заключается в посеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на агаризованную питательную среду в чашках Петри и в подсчете формирующихся колоний. Следует иметь в виду, что каждая колония — потомство одной жизнеспособной клетки. Существует много вариантов данного метода.

При *посеве на поверхность агара (метод Коха)* проводят три этапа: приготовление разведений исследуемого материала, посев на агаризованную среду в чашках Петри и подсчет сформировавшихся колоний.

Для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений, так как численность микробных популяций обычно достаточно велика. Разведения готовят в физиологическом растворе, используя шаг разведения 10^{-1} . Для этого стерильный физиологический раствор разливают по 4,5 мл в стерильные пробирки, соблюдая правила асептики. Затем 0,5 мл исследуемого материала стерильной пипеткой вносят в пробирку с 4,5 мл физиологического раствора и считают это разведение первым (10^{-1}). Содержимое пробирки тщательно перемешивают, новой стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл суспензии и переносят во вторую пробирку, получая при этом второе разведение (10^{-2}). Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов: чем она выше, тем больше разведений следует использовать.

При проведении посева на поверхность подсушенной агаризованной питательной среды в чашке Петри стерильной пипеткой наносят точно отмеренный объем (0,1 мл) соответствующего разведения взвеси микроорганизмов и распределяют стерильным шпателем по всей поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем делают два параллельных посева на отдельные чашки. Посев из каждого разведения следует проводить новой стерильной пипеткой и заново стерилизовать шпатель. После посева чашки помещают в термостат крышками вниз (рис. 8).

Подсчет выросших колоний делают обычно через сутки инкубирования для большинства бактериальных клеток, через 5–7 суток — для актиномицетов и дрожжей, через 7–14 суток — для колоний мицелиальных грибов.

При расчете количества клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии суммируют результаты параллельных высевок из одного и того же разведения и определяют среднее количество колоний,

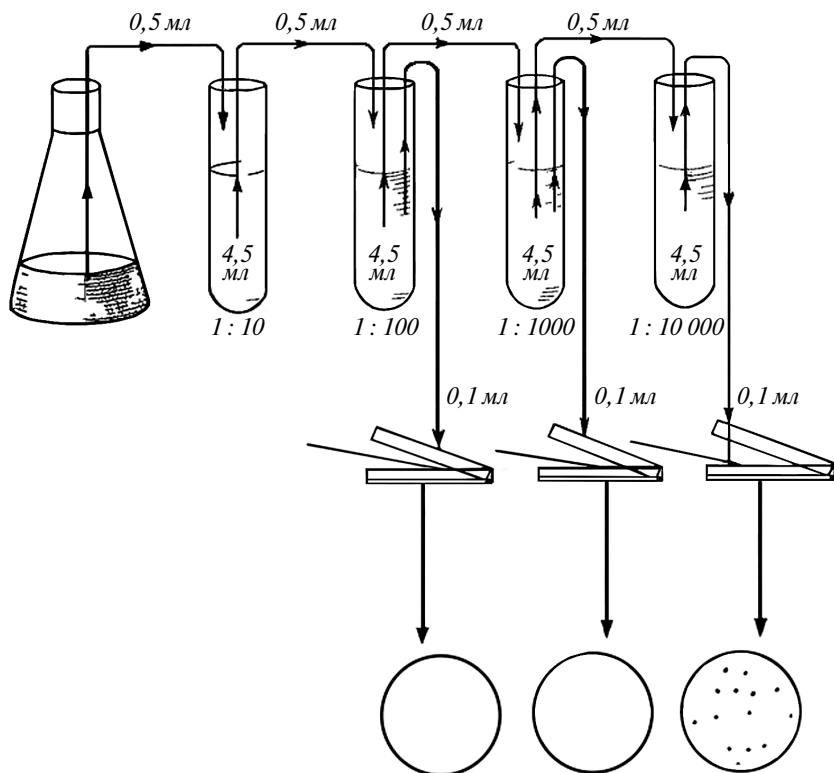


Рис. 8. Схема постановки эксперимента по определению количества жизнеспособных клеток бактерий чашечным методом Коха

сформировавшихся на чашке Петри для данного разведения. Лучшим и наиболее достоверным среди использованных разведений следует считать то, при высеве из которого на агаризованной питательной среде сформировалось от 30 до 300 колоний. Нижний предел устанавливается из соображений статистической достоверности, верхний – из-за опасности слияния отдельных колоний. Полученные данные подставляют в формулу

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

где M – количество клеток в 1 мл; a – среднее количество колоний на чашке Петри при высеве из данного разведения; V – объем суспензии, взятой для посева, мл; 10 – коэффициент разведения; n – порядковый номер разведения, из которого сделан высев.

Метод посева в агаризованную среду осуществляют путем внесения в стерильную чашку Петри 1 мл суспензии микроорганизмов из соответствующего разведения с последующим добавлением 15–20 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С агаризованной среды. Содержимое чашки тщательно перемешивают легкими вращательными движениями и дают среде застыть. Засеянные таким образом чашки помещают в термостат и инкубируют необходимое время.

Метод посева в тонком слое предполагает внесение разведенной суспензии микроорганизмов в пробирки с небольшим объемом (2,5–3,5 мл) расплавленной полужидкой (0,7 %-ной) агаризованной среды, которую затем разливают по стерильным чашкам, уже содержащим один слой застывшей агаризованной (1,5 %-ной) среды, и дают застыть верхнему слою.

Каждый из перечисленных методов посева имеет свою область использования и определенные ограничения. При посеве на поверхность агаризованной среды все выросшие колонии являются поверхностными. Именно в этом случае изучают характерные изменения в индикаторных агаровых средах. При посеве в агаризованные среды колонии, как правило, компактны и невелики по размерам, так как формируются в слое агара, что дает возможность учета большого их количества. Вторым преимуществом метода является возможность дополнительных манипуляций с составом среды: верхний и нижний слои могут содержать разные питательные добавки. Кроме того, к верхнему слою могут быть добавлены красители для облегчения обнаружения колоний.

При использовании любого из описанных приемов следует помнить, что его точность ограничена ошибкой метода, которая может быть следствием случайного распределения клеток в суспензии, ограниченного числа подсчитанных клеток (колоний), а также техническими погрешностями: неточностью приготовления разведений, повторным учетом одной и той же клетки или колонии и т. п. При выполнении всех операций требуются также особая чистота и аккуратность.

Определение количества жизнеспособных клеток методом предельных разведений

Данный метод используют для подсчета клеток тех микроорганизмов, которые плохо или совсем не растут на плотных питательных средах. Метод удобен и позволяет учесть все клетки также в случае, когда они характеризуются разными скоростями роста. В пробирки с жидкой средой вносят строго фиксированный объем суспензии из различных субстратов природного происхождения. После инкубирования, исходя из количества пробирок, в которых наблюдался или отсутствовал рост клеток, рассчитывают наиболее вероятное число клеток, содержащихся в 1 мл субстрата.

Приготовление разведений производят, как и при использовании чашечного метода. Из четырех – пяти последних разведений производят засев 1 мл суспензии в три – пять пробирок со стерильной средой одинакового объема (параллельные пробирки). После инкубирования регистрируют рост микроорганизмов, определяя помутнение среды, образование пленки, газа, осадка и т. д.

Наиболее вероятное число клеток в единице объема рассчитывают по специальной таблице Мак-Креди, разработанной на основе методов вариационной статистики. Для этого составляют числовую характеристику из трех цифр. Первая показывает число пробирок в последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост культуры. Две следующие цифры соответствуют числу пробирок, в которых был отмечен рост клеток при высеве из двух последующих разведений. Количество клеток в 1 мл исходного субстрата соответствует этому числу, умноженному на то разведение, которое было взято для получения первой цифры числовой характеристики (табл. 6).

Таблица 6

Расчет наиболее вероятного количества клеток в единице объема методом предельных разведений

Разведение исходной суспензии	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	3	3	3	3	3
Число пробирок, в которых обнаружен рост	3	3	2	0	0
Числовая характеристика	320	–	–	–	–
Наиболее вероятное число клеток (определяют по таблице Мак-Креди)	9,5	–	–	–	–
Количество клеток в 1 мл исходной суспензии	$9,5 \times 10^3$	–	–	–	–

З а д а н и е

Проведите посев суспензии бактерий на агаризованную питательную среду для определения количества жизнеспособных клеток методом Коха.

11. ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Факторы внешней среды, действующие на микроорганизмы, разделяют на физические и химические. Их эффект может быть как стимулирующим рост микробных клеток (химические вещества, используемые для поддержания жизнедеятельности, оптимальная температура и т. д.), так и угнетающим его.

Химические или физические факторы природы, полностью или частично подавляющие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к **микростатическим**. **Микробоцидные** факторы вызывают гибель микроорганизмов. Характер действия (микробоцидный или микростатический) зависит от природы, концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма.

Химические факторы по характеру действия на клетку могут быть разделены:

- на повреждающие поверхностные структуры клетки и нарушающие проницаемость цитоплазматической мембраны (фенолы, крезолы, спирты, нейтральные мыла, поверхностно-активные вещества, некоторые антибиотики);
- повреждающие ферменты и вызывающие нарушение обмена веществ (ионы тяжелых металлов, спирты, активные окислители);
- влияющие на синтез клеточных компонентов (некоторые антибиотики, антиметаболиты).

К **физическим факторам**, оказывающим выраженное действие на микроорганизмы, принадлежат: температура, осмотическое и гидростатическое давление, ионизирующая радиация, УФ-свет, ультразвук, механические воздействия и т. д.

Действие физических и химических факторов на микроорганизмы определяют по изменению характера их роста по сравнению с культурой, не подвергшейся воздействию. Количественные данные относительно действия факторов внешней среды на микроорганизмы можно получить только для популяции, но не для отдельных клеток.

Изучение действия УФ-лучей на бактерии

Среди разнообразных видов излучения, применяемых в качестве летальной действующих или мутагенных агентов, наиболее часто используются ультрафиолетовые и ионизирующие лучи, различающиеся между собой длиной волны. В диапазоне длин волн от 10 до 400 нм говорят об ультрафиолетовых лучах, а в диапазоне от 10^{-3} до 10 нм — об электромагнитном ионизирующем излучении.

Ионизирующие излучения вызывают образование свободных радикалов и органических перекисей, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, вызывая одно- и двунитевые разрывы в ДНК, изменения азотистых оснований, окисление сульфгидрильных групп белков в сульфидные и т. д.

Основные фотопродукты в ДНК после действия УФ-лучей — циклобутановые димеры тиминовых оснований, располагающиеся в одной нити.

Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, когда отмечается максимум их поглощения молекулами ДНК.

Влияние УФ-лучей на клетки микроорганизмов может быть проведено и оценено в эксперименте как в качественном, так и в количественном выражении.

При *качественном определении* чувствительности бактерий к УФ-облучению 0,1 мл 18-часовой бактериальной культуры, выращенной в жидкой питательной среде, засевают с помощью шпателя на поверхность полноценной агаризованной среды в чашке Петри. После этого на поверхность среды помещают диск плотной бумаги в качестве экрана, защищающего клетки бактерий от воздействия УФ-лучей. Облучение проводят в открытых чашках Петри с помощью бактерицидной лампы ДБ-15 в течение 3 мин на расстоянии 40 см. По окончании облучения стерильным пинцетом снимают диск бумаги, чашки Петри закрывают и помещают в термостат для инкубирования при оптимальной для данного вида температуре. При учете результатов отмечают, что культура является чувствительной к УФ-лучам, если сплошной рост клеток наблюдается только в зоне защитного диска, на остальной поверхности среды в чашке формируются единичные колонии или наблюдается полное отсутствие их роста.

При *количественной оценке*, т. е. определении зависимости выживаемости бактерий от дозы УФ-лучей, учитывают влияние ряда факторов.

1. Большое значение имеет плотность (концентрация) клеток бактериальной взвеси, подвергшейся облучению. УФ-лучи интенсивно поглощаются бактериальными клетками, но при высокой концентрации может наблюдаться эффект их экранирования друг другом. Последнее обстоятельство не играет существенной роли при концентрациях взвеси, не превышающих 10^4 кл/мл. В случае использования густой взвеси во время облучения ее постоянно необходимо перемешивать. Бактериальную суспензию следует распределять тонким слоем, поскольку УФ-лучи характеризуются низкой проникающей способностью, в силу чего клетки, располагающиеся более глубоко, не подвергаются их воздействию.

2. Выживаемость клеток зависит от состава среды, используемой для их суспендирования. Лучше проводить облучение в буферных растворах. Жидкая полноценная питательная среда способна более интенсивно поглощать УФ-лучи по сравнению с буферными растворами, поэтому получаемая клетками доза облучения уменьшается. Кроме того, при облучении в жидкой полноценной питательной среде могут образовываться токсические продукты, увеличивающие летальный эффект УФ-лучей, что влияет на интерпретацию результатов.

3. Летальный эффект УФ-лучей определяется также и физиологическим состоянием клеток, прежде всего возрастом культуры. Клетки, находящиеся в экспоненциальной стадии роста, более чувствительны к действию УФ-лучей. При постановке экспериментов необходима культура бактерий в экспоненциальной стадии роста. Для ее получения бактериальные клетки накануне занятия засевают в жидкую полноценную питательную среду и инкубируют в течение 18 ч при оптимальной температуре. Выросшую культуру разводят жидкой полноценной питательной средой в соотношении 1:10 и инкубируют еще 2 ч при аэрировании на специальном шейкере. Затем бактериальные клетки отмывают от питательной среды путем центрифугирования, образующийся осадок ресуспендируют в исходном объеме фосфатного буфера или физиологического раствора до определенной плотности. Для постановки экспериментов обычно необходимо 30–50 мл такой суспензии.

Облучение культуры осуществляют в открытых чашках Петри в течение заданного времени (30, 60, 90, 120 и 240 с) на расстоянии 40 см от источника. Для каждой дозы используют отдельную чашку, в которую наливают по 5 мл суспензии. Взвесь клеток, не подвергавшаяся облучению, служит контролем. Во время облучения содержимое чашек перемешивают путем легкого покачивания.

Для определения количества жизнеспособных клеток отбирают пробы из контрольного и пяти облученных образцов после серии десятикратных разведений в физиологическом растворе. Из последних разведений в нескольких повторениях проводят высевы на поверхность агаризованной полноценной питательной среды в чашках Петри.

Чашки помещают в термостат при оптимальной для роста исследуемых бактерий температуре до появления колоний. Подсчитывают их количество, определяют титр клеток и выживаемость бактерий после облучения УФ-лучами в процентах от контроля. Данные вносят в табл. 7.

Таблица 7

Выживаемость бактериальных клеток в зависимости от дозы облучения УФ-лучами

Вариант опыта	Время облучения, с	Степень разведения	Количество		Выживаемость, %
			колоний	клеток/мл	
Контроль	0	10^{-5}	85/95	9×10^7	100
1	30	10^{-4}	317/283	3×10^7	
2	60	10^{-4}	96/84	9×10^6	
3	90	10^{-3}	52/58	6×10^6	
4	120	10^{-3}	32/28	3×10^6	
5	240	10^{-2}	64/56	6×10^5	

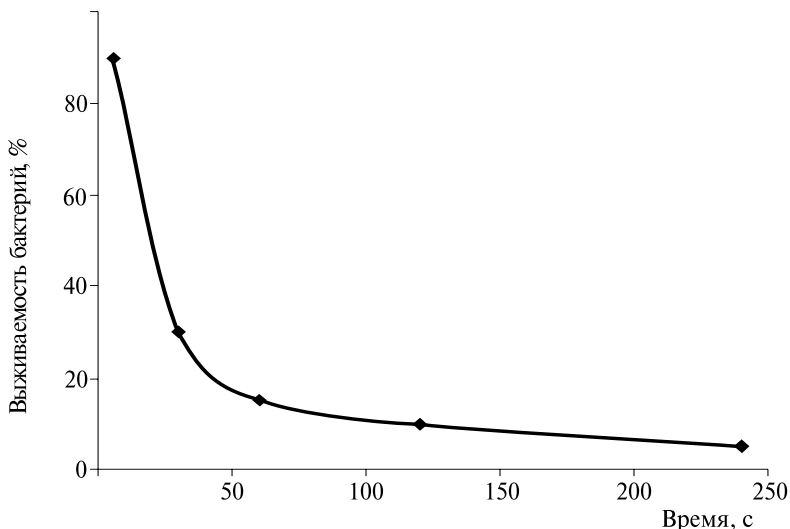


Рис. 9. Инактивирующее действие УФ-лучей на клетки

Выживаемость клеток, облученных УФ-лучами, выражают графически (рис. 9). На оси абсцисс отмечают время облучения, на оси ординат — выживаемость клеток в процентах по отношению к контролю.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к другим видам организмов (клеток) или вирусов, оказывая микробостатический или микробоцидный эффект. Такие вещества природного происхождения можно назвать антимикробными в широком смысле или антибиотиками в более узком. Наиболее часто активными продуцентами антибиотических веществ являются мицелиальные грибы, актиномицеты (особенно представители стрептомицетов) и спорообразующие бактерии.

Существует несколько методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Наибольшее практическое распространение получили метод бумажных дисков (или диско-диффузионный), пропитанных растворами антибиотиков, и метод серийных разведений антибиотика в жидкой или агаризованной питательной среде.

Определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Концентрация антибиотиков в стандартных дисках подобрана таким образом, чтобы при их использовании диаметр зоны задержки роста специально подобранных тест-организмов находился в определенном диапазоне (от 0 до 30–40 мм).

Бактерии исследуемого штамма (0,1 мл суспензии с плотностью около 10^7 – 10^8 кл/мл, находящейся в стационарной стадии роста) высевают шпателем на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Затем стерильным пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные, выпускаемые промышленностью, бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста исследуемых бактерий. Если бактерии чувствительны к данному соединению, то вокруг дисков образуется зона задержки роста. Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику (рис. 10). Диаметр зоны задержки роста более 25–30 мм обычно соответствует высокой степени чувствительности, менее 10 мм – слабой.

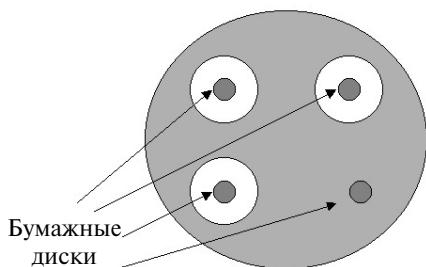


Рис. 10. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков (затемненная часть – рост бактерий, светлая зона – отсутствие видимого роста)

Метод серийных разведений антибиотика в жидкой питательной среде позволяет путем определения минимальной ингибирующей концентрации антибиотика количественно охарактеризовать его активность в отношении исследуемых микроорганизмов. Для правильной постановки эксперимента необходимы:

- питательные среды, обеспечивающие оптимальные условия роста исследуемого микроорганизма и не содержащие веществ, инактивирующих антибиотик;
- растворы антибиотиков;

● культуры микроорганизмов, исследуемые на чувствительность к антибиотикам.

Работу начинают с приготовления растворов антибиотика. Для этого в ряд стерильных пробирок наливают по 2 мл жидкой полноценной питательной среды (рис. 11). В пробирку 1 вносят 2 мл раствора антибиотика (исходная концентрация препарата 200–500 мкг/мл), смесь тщательно перемешивают. После этого 2 мл жидкости из пробирки 1 стерильной пипеткой переносят в пробирку 2, повторяя перемешивание, далее 2 мл из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т. д. Из пробирки 4 удаляют 2 мл раствора антибиотика. При таком способе разведения в каждой последующей пробирке концентрация антибиотика будет в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Среда в пробирке 5 не должна содержать раствора антибиотика и служит контрольной для определения роста культуры.

После приготовления разведений во все пробирки вносят по 0,1 мл взвеси клеток с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 10^5 – 10^4 клеток. Пробирки энергично перемешивают и помещают на 18–20 ч для выращивания при оптимальной для роста исследуемых бактерий температуре. Учет результатов проводят следующим образом: вначале просматривают контрольную пробирку, чтобы по помутнению среды определить наличие роста микроорганизмов. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более 10^7 кл/мл). Среда же в пробирках, содержащих антибиотик в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной.

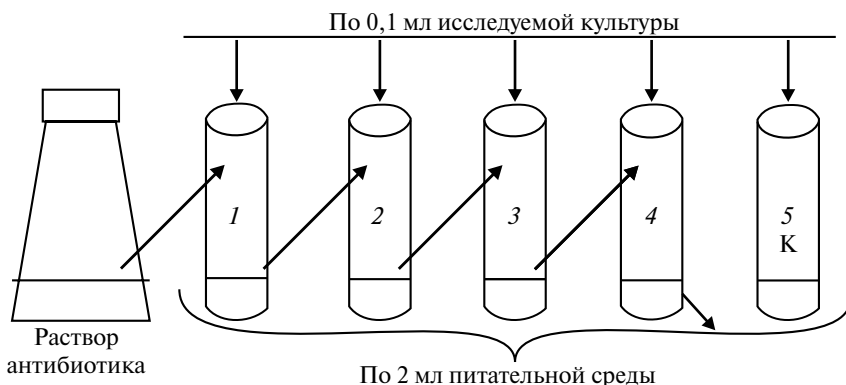


Рис. 11. Схема эксперимента по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотику методом серийных разведений препарата в жидкой питательной среде (К – контроль)

Наименьшая концентрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое пробирок остается прозрачным, соответствует минимальной ингибирующей (подавляющей) рост концентрации данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма.

Для определения характера (микробостатического или микробоцидного) действия антибиотика на рост бактерий требуется постановка дополнительных экспериментов. Для этого бактериологической петлей из пробирок, содержимое которых не помутнело, проводят посев на полноценную питательную агаризованную среду. Наличие роста культуры после инкубирования говорит о микробостатическом, т. е. задерживающем рост клеток, действии антибиотика, а отсутствие признаков роста является свидетельством того, что при такой концентрации развитие микроорганизмов полностью подавляется данным соединением и, следовательно, она является микробоцидной.

Метод серийных разведений антибиотика в агаризованной среде удобен тем, что позволяет в одном опыте проверить чувствительность к данному антибиотику нескольких микроорганизмов. Разведения антибиотика готовят в стерильной агаризованной среде. Для этого в нее добавляют требуемое количество исходного раствора антибиотика, тщательно перемешивают и заливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара дно чашки с наружной стороны делят маркером на сектора. Каждую исследуемую культуру засевают штрихом с помощью бактериологической петли на отдельный сектор в чашках с разными концентрациями антибиотика.

Чашки помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста и развития изучаемых бактерий, и инкубируют в течение 48–72 ч. Результаты учитывают по наличию или отсутствию роста бактерий по сравнению с ростом на среде без антибиотика. Бактерии считаются чувствительными к антибиотику в такой его концентрации, при которой их рост полностью подавляется.

З а д а н и я

1. Проведите эксперимент по качественному определению чувствительности бактерий к УФ-лучам.
2. Проведите эксперимент по определению чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков.
3. Проведите эксперимент по определению чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений антибиотика в жидкой полноценной питательной среде.

12. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ

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

Собственно симбиоз – взаимоотношения, при которых два или более вида микроорганизмов при совместном развитии создают для себя взаимовыгодные условия. Примером таких взаимоотношений являются взаимоотношения в кефирных зернах, в которых одновременно развиваются молочнокислые бактерии и дрожжи; при этом молочнокислые бактерии, испытывающие потребность в витаминах, получают их в результате развития дрожжей; последние получают благоприятные условия для развития за счет подкисления среды.

В некоторых случаях симбиотические взаимоотношения приводят к формированию так называемого консорциума, в котором клетки как бы объединены в один организм. Примером может служить консорциум *Pelochromatium roseum*. В центре консорциума находятся относительно крупные подвижные бактерии рода *Desulfotomaculum*. На их поверхности располагаются клетки зеленых серобактерий рода *Chlorobium*. В светлой зоне водоема в анаэробных условиях серобактерии обеспечивают поступление органического вещества и окисленной серы, а сульфатредуцирующие бактерии снабжают консорциум восстановителем.

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

При **метабиозе** продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляются другими микроорганизмами в качестве питательного материала. Это

почти всегда происходит при последовательном употреблении какого-либо субстрата. При использовании белковых субстратов в метабиозе последовательно могут принимать участие аммонификаторы, нитрификаторы и денитрификаторы.

В случае метабиоза складываются синтрофные связи, при которых субстрат используется одновременно несколькими видами микроорганизмов. В частности, некоторые инфекционные заболевания человека являются полимикробными, т. е. вызываются синтрофными ассоциациями бактерий. Газовая гангрена, например, обусловлена действием нескольких возбудителей из рода *Clostridium* в ассоциации с различными аэробными бактериями, главным образом стафилококками и стрептококками.

Разновидностью метабиоза является **сателлитизм**, при котором одни микроорганизмы выделяют в среду ростовые вещества (аминокислоты, витамины и др.), обеспечивающие развитие других.

При **синергизме** у членов микробной ассоциации взаимно повышается физиологическая активность за счет выделения продуктов, стимулирующих их развитие.

Помимо благоприятных взаимоотношений между микроорганизмами наблюдаются и такие, при которых один вид микроорганизмов полностью или частично подавляет рост и развитие других, т. е. между ними при совместном развитии наблюдается **антагонизм**. В соответствии с причинами, его вызывающими, различают следующие виды антагонизма:

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

2. *Антагонизм, связанный с образованием микроорганизмами органических кислот, спиртов, сидерофоров или других продуктов обмена, которые изменяют условия среды, делая ее непригодной для развития других микроорганизмов.* Характерным примером являются взаимоотношения молочнокислых и гнилостных бактерий в парном молоке. Изначально парное молоко содержит 94–96 % гнилостных и только 4–6 % молочнокислых бактерий. Однако в результате размножения молочнокислых бактерий накапливается молочная кислота и молоко значительно подкисляется. В этих условиях наблюдается подавление роста, а затем и полная гибель гнилостных бактерий.

При развитии уробактерий на среде, содержащей мочевины, происходит ее дезаминирование. Аммиак выделяется в таком количестве, которого достаточно для подщелачивания среды до pH 9,0. При этом развитие других микроорганизмов сильно замедляется или прекращается полностью.

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

Сущность процесса **хищничества** состоит в том, что некоторые микроорганизмы за счет продукции синтезируемых ими ферментов разрушают клетки других видов микроорганизмов и используют их в качестве питательного субстрата. К числу микроорганизмов-хищников относят главным образом миксоформы (миксобактерии, миксомикоты), а также некоторые микроскопические грибы.

Паразитизм характеризуется тем, что один вид микроорганизмов (паразит) поселяется в клетках другого (хозяина) и питается за его счет. облигатные паразиты не могут развиваться в отсутствие хозяина. Бактерии-паразиты утратили способность синтезировать многие вещества; они получают их в готовом виде от своего хозяина. Случаи паразитизма в мире микроорганизмов относительно редки. Так, бактерии рода *Metallogenium*, состоящие из тонких нитей, пропитанных оксидами железа и марганца, часто паразитируют на клетках или колониях бактерий, водорослей, грибов. К паразитам могут быть отнесены грам-отрицательные бактерии рода *Bdellovibrio*. Бделловибрионы проникают в периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий и используют в качестве пищи продукты их метаболизма. К типичным паразитам относятся также бактериофаги.

Наиболее существенной формой конкурентных взаимоотношений, имеющей важное практическое использование, является образование микробами-продуцентами специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих развитие микроорганизмов других видов.

Для выделения микробов-антагонистов из естественных мест обитания применяют разнообразные методы. В основу большинства из них положен принцип выделения чистой культуры микроорганизма — продуцента антибактериального вещества и непосредственного испытания его действия по отношению к применяемым тест-организмам. В качестве тест-объектов используют представителей различных культур, в первую очередь *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, дрожжи родов *Candida*, *Saccharomyces*. При необходимости этот список может быть дополнен.

Микроорганизмы — продуценты антимикробных веществ — выделяют из субстратов, где активно развиваются бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Например, на поверхность питательной среды, предварительно засеянной тест-организмом, петлей наносят взвесь почвы. Через 48–72 ч инкубирования на среде вокруг нанесенной почвенной суспензии формируются колонии и вокруг некоторых из них наблюдаются зоны задержки роста тест-организма. Такие колонии отбирают и исследуют далее.

При определении же антагонистической активности данного штамма по отношению к другим видам или штаммам основной принцип заключается в создании условий для совместного культивирования антагонистов на агаризованных или в жидких питательных средах. Наличие и величина зоны задержки роста указывают на степень антагонистической активности. Кроме того, следует учитывать и плотность культуры тест-организма, состав и толщину слоя агаризованной среды, температуру инкубирования и другие факторы. Существует множество методических приемов, обеспечивающих решение данной задачи.

При использовании **метода перпендикулярных штрихов** на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антимикробное вещество. Посев делают по диаметру чашки, которую затем помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста. Продолжительность культивирования определяется скоростью роста антагониста. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду перпендикулярно к выросшему штриху подсевают штрихами тест-культуры начиная от краев чашки. Чашки помещают в термостат на 48 ч. Если изучаемый микроорганизм-антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем чувствительнее тест-культура к продуцируемому антимикробному веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха (рис. 12).

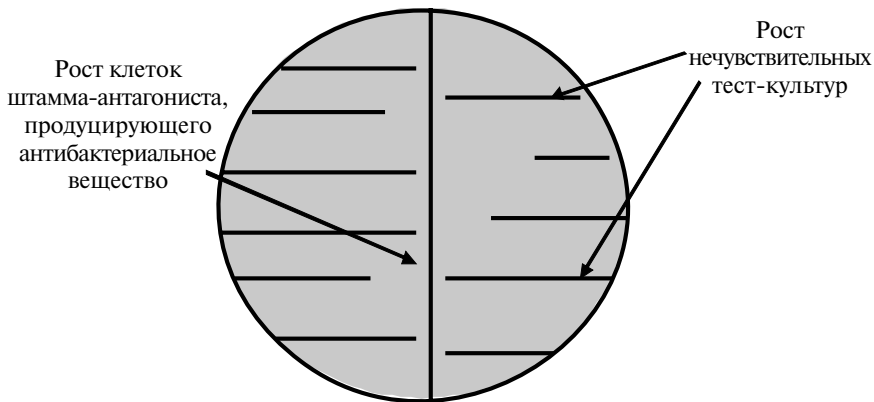


Рис. 12. Определение антагонистической активности микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов

Этот метод имеет ряд недостатков: микробы-антагонисты и тест-культуры выращиваются на одной среде, хотя она не всегда может быть благоприятна как для развития продуцента и образования им антимикробных веществ, так и для роста испытуемых тест-культур. Однако использование метода позволяет одновременно проверить чувствительность большого числа культур к известному антагонисту.

Метод агаровых блоков удобен тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах.

Исучаемый на антагонистическую активность микроорганизм (0,1 мл жидкой культуры) засевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе роста сформировался «сплошной газон». После того как клетки микроорганизма-продуцента хорошо вырастут, стерильным пробочным сверлом (или пробиркой) вырезают агаровые блоки, которые переносят на поверхность среды в другой чашке Петри, предварительно засеянную при помощи шпателя тест-культурой. Агаровые блоки накладывают ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к агаризованной среде. На одной чашке Петри можно разместить четыре-пять агаровых блоков с различными продуцентами антимикробных веществ. Чашки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-культуры. В случае чувствительности последней к антибактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста. Чем больше выделяется антимикробного вещества, чем оно активнее и лучше диффундирует в среде, тем больше будет диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антимикробному веществу данного продуцента клетки растут на всей поверхности среды (рис.13).

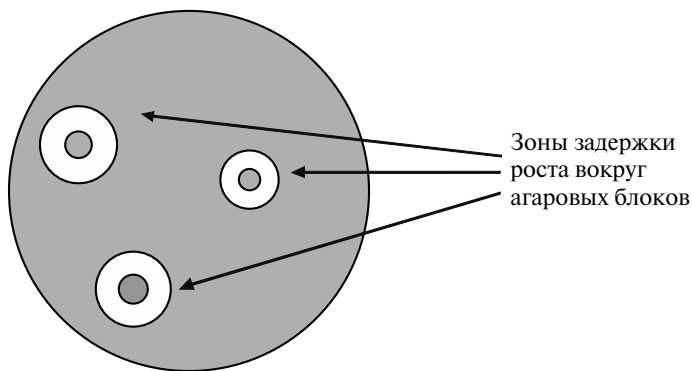


Рис. 13. Определение антагонистической активности методом агаровых блоков

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

Изучение антагонистических взаимоотношений при совместном культивировании в жидкой питательной среде основано на подсчете числа жизнеспособных особей после совместного культивирования двух штаммов микроорганизмов, клетки которых при этом должны отличаться друг от друга по легко определяемым признакам (пигментация, сбраживание углеводов, устойчивость к антибиотикам, ауксотрофность и др.). Кроме того, необходимо, чтобы оба микроорганизма одинаково хорошо росли при используемых условиях (температура, состав среды и т. д.).

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

З а д а н и я

1. Определите чувствительность исследуемых бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков и методом серийных разведений антибиотика в жидкой среде.

2. Изучите микробный антагонизм методом агаровых блоков.
3. Изучите продукцию бактериоцинов методом отсроченного антагонизма.
4. Заполните табл. 8.

Таблица 8

Характер взаимоотношений между видами микроорганизмов

Тип взаимоотношений	Вид		Общий характер и примеры
	1	2	
Нейтрализм	0	0	Ни один вид не влияет на другие виды и не ограничивает их развитие. Взаимоотношения между микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры организма
Собственно симбиоз			
Метабиоз			
Сателлитизм			
Комменсализм			
Антагонизм			
Паразитизм			
Хищничество			

Примечание: «0» – отсутствие значимых взаимодействий; «+» – улучшение роста или другой положительный эффект «-» – замедление или ухудшение других параметров роста.

13. НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ

Генетическая информация в бактериальных клетках заключена в ДНК хромосомы (или хромосом), состоящей из нескольких тысяч генов, а также во внехромосомных генетических элементах (структурах), называемых плазмидами. Именно эти структуры создают материальную основу наследственности, обеспечивающую хранение и передачу информации, а также преемственность между поколениями.

Различают ненаследственную и наследственную изменчивость бактерий.

Ненаследственная (фенотипическая, модификационная) изменчивость. Ненаследственная изменчивость адаптивна, направлена на приспособление к изменению факторов внешней среды, но является генетически детерминированной в пределах нормы реакции. При смене внешних условий большинство клеток популяции претерпевает изме-

нения приспособительного характера, вызванные регуляцией клеточного метаболизма. Примером адаптации к изменяющимся условиям среды на уровне популяции являются диссоциации.

Диссоциация — это явление морфофизиологической гетерогенности популяции, визуально выражающееся в развитии фенотипически разных колоний при расसेве чистой культуры. Такая гетерогенность имеет генетическую природу и в отличие от спонтанных мутаций носит обратимый характер и наблюдается с более высокой частотой. Типичным примером диссоциации у микроорганизмов можно считать формирование трех различных типов колоний: *R* — шероховатых, *S* — гладких и *M* — слизистых. В таких случаях образующиеся из чистой культуры колонии могут характеризоваться разным диаметром, в них обнаруживаются разные типы клеток, их общее количество одинаково, хотя и упакованы они по-разному. В данном примере различия в морфологии колоний проявляются только на богатой углеводами среде. На клеточном уровне различия касаются способа расхождения делящихся клеток, клеточных оболочек (разная толщина и состав капсул, толщина клеточных стенок), химического состава вещества капсул, количества ненасыщенных липидов в мембранах и др. Это приводит к разной скорости поглощения и секреции веществ, активности мембранных ферментов, устойчивости к токсическим веществам.

Модифицирующее действие факторов внешней среды на микроорганизмы можно наблюдать (регистрировать) на примере влияния температуры на продукцию красного пигмента продигиозина бактериями *Serratia marcescens*. Для этого данную культуру засевают на поверхность скошенного агара в две пробирки, которые инкубируют при температуре 28 и 37 °С. Через 48 ч учитывают наличие или отсутствие образования пигмента в заданных условиях.

Наследственная (генотипическая) изменчивость. Наследственная изменчивость может быть мутационной и рекомбинационной. **Мутации**, т. е. наследуемые изменения генетического материала, представляют собой важное биологическое явление и материал для эволюции. Несмотря на стабильность, гены подвергаются случайным внезапным изменениям (мутациям), в результате чего появляются новые варианты, функционально отличные от исходного гена.

В случае **рекомбинационной изменчивости** речь идет о генетической рекомбинации, т. е. о переносе генов, участков хромосом или плазмид. Обычно рассматривают три типа переноса генов у бактерий: трансформацию, конъюгацию и трансдукцию. Наряду с процессом мутирования

генов они играют важную роль в появлении новых типов бактериальных клеток. Изучение способов генетического обмена и механизмов возникновения мутаций позволяет выяснить генетические и биохимические аспекты функционирования бактерий, установить принципы строения, экспрессии и регуляции активности генов, синтеза макромолекул, роста и деления клеток.

Выделение мутантов бактерий

Мутации и индукция новых мутаций мутагенами представляют собой ценный инструмент в генетических и биохимических исследованиях. Во-первых, изменения, которые вызывает мутация в определенном гене, позволяют не только идентифицировать этот ген, но и точно указать его место в хромосоме с помощью методов генетического картирования. Во-вторых, анализ мутантных штаммов, у которых нарушены разные этапы сложной цепи биохимических процессов, может вскрыть детали организации генетического и биохимического аппаратов. В-третьих, знание механизмов действия различных мутагенов может помочь в установлении корреляции между мутагенным и канцерогенным действием множества факторов окружающей среды (химические агенты, радиоактивное излучение и др.). В-четвертых, мутации являются основой для селекции штаммов с полезными свойствами. В-пятых, исследование структуры биополимеров, измененных в результате мутагенных воздействий, способствует установлению их структуры и функций.

По своему происхождению мутации могут быть **спонтанными** и **индуцированными**. Для того чтобы использовать индуцированный мутагенез в генетических исследованиях, необходимо согласованно провести ряд последовательных этапов работы:

1. Определить, какой тип мутанта соответствует цели исследования (делеционный, с точковой мутацией, с заменой пар оснований, условно-летальный и т. д.) (табл. 9).

2. Выбрать наиболее подходящий мутаген для индукции мутаций, что определяется двумя факторами: типом мутации, которую хотят получить, и относительной эффективностью мутагена в отношении желаемой мутации. Например, этилметансульфонат (ЭМС), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (нитрозогуанидин – НГ), гидроксилламин и азотистая кислота вызывают преимущественно простую замену пар оснований (транзиции). Характер действия некоторых наиболее часто используемых мутагенов приведен в табл. 10.

Таблица 9

Структурно-функциональная характеристика мутаций у бактерий

Тип мутаций	Примеры мутагенов	Природа изменений в ДНК	Тип мутирующих генов	Влияние на функцию гена	Обратимость мутации	Супрессируемость тРНК
Транзиции	УФ-лучи, гидроксилламин, нитрозогуанидин	Простая замена оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	Да	Да
Трансверсии	УФ-лучи, нитрозогуанидин	Сложная замена оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	Да	Да
Миссенс	Любые	Замены оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	Да	Да
Нонсенс	Любые	Замены оснований	Гены, кодирующие белок	Полная потеря функции	Да	Да
Мутации других типов	Любые	Замены оснований	Регуляторные области, гены для тРНК и рРНК	Различное	Да	Нет
Делеции	УФ-лучи, азотистая кислота	Потеря участка в ДНК	Любые	Полная потеря функции	Нет	Нет
Вставки	Акридиновые красители, бромистый этидий	Включение генома фага или транспозона	Любые	Полная потеря функции	Да	Нет
Со сдвигом рамки считывания	Акридиновые красители, бромистый этидий	Вставки или делеции	Гены, кодирующие белок	Полная потеря функции	Да	Да

Свойства некоторых часто используемых мутагенов

Тип мутагенного фактора	Механизм мутагенеза	Тип возникающей мутации	Эффективность
УФ-лучи	Димеризация пиримидинов	Делеции, инверсии	Средняя
Аналоги азотистых оснований	Ошибки в репликации ДНК	Транзиции типа АТ-ГЦ	Низкая
Азотистая кислота	Деаминарование цитозина и аденина	Транзиции в обоих направлениях, делеции	Средняя
Нитрозогуанидин	Алкилирование оснований в репликативной вилке	Преимущественно транзиции типа ГЦ-АТ	Очень высокая
Этилметансульфонат	Алкилирование гуанина	Преимущественно транзиции типа ГЦ-АТ, АТ-ГЦ; трансверсии	Средняя
Акридиновые красители, этидиум бромид	Интеркаляция между азотистыми основаниями	Сдвиг рамки считывания, элиминация плазмид	Низкая
Новобиоцин (антибиотик)	Блокирование репликации ДНК	Элиминация плазмид	Высокая

3. Создать условия для выражения (экспрессии) новой мутации. Это обусловлено тем, что практически при любых условиях роста бактериальная клетка содержит от полутора до двух копий хромосом; следовательно, мутация проявится через определенное время (сегрегационный лаг-период). Для фенотипического проявления мутации необходимо также прохождение процессов транскрипции и трансляции. В связи с этим целесообразно культуру клеток, обработанную мутагеном, в течение определенного времени инкубировать и тем самым исключить возможность присутствия в клетках исходных хромосом и сохранить в них только хромосомы, содержащие мутации (фенотипический лаг-период). Длительность культивирования зависит как от времени генерации исследуемых бактерий, так и от других особенностей роста клеток.

4. Провести обогащение по желаемому мутанту для повышения вероятности его выделения. Обычно возникновение мутаций (даже при использовании сильных мутагенов) – относительно редкое событие (10^{-6} – 10^{-7}). Особенно трудно выделить мутантные клетки, если применяются непрямые методы селекции. В самой распространенной методике обогащения используется антибиотик пенициллин. Суть данного

приема сводится к следующему. При выращивании культуры, содержащей как мутировавшие, так и немутантные клетки в синтетической среде, не обеспечивающей рост мутантов, пенициллин вызывает избирательную гибель только активно делящихся клеток (или клеток бактерий «дикого типа»), нарушая у них процесс синтеза клеточной стенки. В оптимальных условиях можно достичь 1000-кратного обогащения популяции клеток мутантными формами.

5. Обнаружить новый мутант соответствующими прямыми или непрямыми методами отбора.

6. Изучить свойства мутанта, картировать локус новой мутации, т. е. определить ее локализацию на бактериальной хромосоме.

Получение мутантов, устойчивых к антибиотикам (прямой отбор)

Мутанты, устойчивые к антибиотикам, выявить довольно легко, а сами уровни устойчивости могут служить удобными генетическими маркерами, характеризующими бактериальный штамм. Для их выделения в чашки Петри вносят питательный агар (10 мл) и оставляют застывать при таком наклоне чашек, чтобы агар получился скошенным. После этого чашки ставят горизонтально и наливают в каждую еще 10 мл агара с любым из антибиотиков в заданной концентрации (50, 100, 200 мкг/мл). В результате формируется градиент концентрации антибиотика от 0 мкг/мл на одном из краев чашки до максимальной — на другом.

Культуру бактерий выращивают в полноценной жидкой среде до середины логарифмической стадии роста. По 0,1 мл культуры распределяют шпателем по поверхности агаризованной среды с градиентом концентрации антибиотика и инкубируют в оптимальных условиях. Отбирают устойчивые колонии и высевают их на чашки с различными концентрациями антибиотика для оценки уровня устойчивости.

Прямой отбор также широко используется для получения ***ревертантов*** (бактерии с обратными мутациями) ауксотрофных мутантов. Культуру ауксотрофных штаммов выращивают в полноценной среде до поздней логарифмической стадии роста, центрифугируют и ресуспендируют в минимальной среде. Затем ее засевают на поверхность агаризованной минимальной среды с помощью шпателя и стерильным пинцетом раскладывают диски из фильтровальной бумаги. На поверхность каждого диска наносят каплю одного из следующих растворов: стерильная вода (контроль), НГ, ЭМС и т. д. Чашки инкубируют, а о вызванных мутагенами обратных мутациях судят по росту колоний вокруг дисков. По полученной картине, зная специфичность мутагенов, можно определить природу исходных мутаций.

Получение ауксотрофных мутантов (непрямой отбор)

Для любой мутации, связанной с потерей генетической функции, требуются такие методы выявления, которые позволили бы идентифицировать очень редко возникающие мутантные клетки на большом фоне немутировавших. В эту группу входят ауксотрофные мутанты, мутанты с изменениями в сбраживании углеводов, морфологические, условно-летальные и другие типы мутантов.

Для получения ауксотрофных мутантов проводят следующие действия:

1. Клетки бактериального штамма выращивают до середины логарифмической стадии роста (5×10^8 кл/мл). Культуру отмывают от питательной среды путем центрифугирования (10 мин при 5000 об/мин), ресуспендируют в цитратном буфере рН 6,0 с нитрозогуанидином в определенной концентрации и выдерживают в течение определенного времени. Используемую концентрацию мутагена и время обработки подбирают экспериментально с таким расчетом, чтобы выживаемость культуры была не ниже 50–10 %.

2. Клетки отмывают от буферной смеси путем центрифугирования, ресуспендируют в жидкой полноценной среде и инкубируют 18–20 ч при оптимальной для роста бактерий температуре.

3. Выросшую культуру осаждают, отмывают минимальной средой (свободной от факторов роста) и культивируют при аэрации в течение 3 ч.

4. К полученной культуре добавляют пенициллин (конечная концентрация 2000 мкг/мл) и продолжают инкубировать еще 2 ч. При использовании пенициллиновой методики необходимо строго соблюдение некоторых условий:

- обрабатываемая пенициллином популяция бактерий не должна содержать более 10^7 кл/мл. При использовании более густой суспензии выделяющиеся в среду продукты лизиса клеток, погибших от пенициллина, будут служить источником ростовых веществ для ауксотрофных мутантов. В результате ауксотрофные клетки начнут делиться и также будут погибать при действии пенициллина. В суспензиях клеток меньшей плотности содержание продуктов лизиса недостаточно для обеспечения роста ауксотрофов;

- обработка популяции бактерий пенициллином не должна быть продолжительной, так как с увеличением времени воздействия антибиотика нарастает количество продуктов лизиса убитых клеток. Обычно используют высокие концентрации при продолжительности воздействия не более 2 ч;

- бактерии, выращенные в полноценной среде, перед обработкой пенициллином нужно отмыть после центрифугирования минимальной средой и выдержать в ней в течение времени, достаточного для четырех-пяти генераций. Это необходимо для истощения эндогенных метаболитов, имеющихся в ауксотрофных клетках, чтобы предотвратить их деление в среде с антибиотиком.

5. Из взвеси клеток готовят ряд последовательных десятикратных разведений в физиологическом растворе и по 0,1 мл из каждого разведения высевают на полноценную агаризованную среду. Чашки инкубируют 24–48 ч.

6. Выросшие на чашках колонии пересевают методом реплик на агаризованные полноценные и минимальные среды. Инкубируют 24–48 ч.

7. Анализируют рост каждого клона на полноценной и минимальной среде. Клоны, которые сформировались только на полноценной, а не на минимальной среде, считают потомством мутантных клеток.

8. Определяют потребности в факторах роста у выделенных ауксотрофных мутантов. Для этого перепечатаывают клоны на минимальный агар с добавками аминокислот в различных комбинациях (табл. 11). Определяют, при наличии каких наборов факторов роста растут мутантные клетки. Эти данные дают возможность сделать вывод о природе нарушения, вызванного мутацией.

Для характеристики мутаций проводят также определение природы изменений в ДНК с анализом, например, обратных мутаций. Частота реверсии – важный параметр, который является мерой генетической стабильности мутации. Критерием, определяющим ценность мутации, является и степень инактивации гена, в котором произошла мутация (полная утрата или частичное сохранение функции).

Таблица 11

Комбинации добавок к минимальной глюкозо-солевой среде для определения потребностей бактерий в факторах роста

Номер набора	1	2	3	4	5
6	Аденин	Гуанин	Цистеин	Метионин	Витамин В1
7	Гистидин	Лейцин	Изолейцин	Валин	Лизин
8	Фенилаланин	Тирозин	Триптофан	Треонин	Пролин
9	Глутаминовая кислота	Серин	Аланин	Аспарагиновая кислота	Аргинин

Примечание: все вещества добавляют до конечной концентрации 20 мкг/мл, В₁ – 4 мкг/мл.

Рекомбинационная изменчивость. Способы генетического обмена у бактерий

В настоящее время описаны четыре способа генетического обмена у бактерий: трансформация (1928), конъюгация (1946), трансдукция (1952) и слияние протопластов (1976). **Трансформация** – процесс передачи генетической информации от донора к реципиенту в виде изолированной внеклеточной ДНК. Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия генетических признаков донора, называется **трансформантом**. При **трансдукции** генетическая информация от донорных к реципиентным клеткам переносится с помощью бактериофагов. Реципиентная клетка, которая таким путем приобретает признаки донора, называется **трансдуктантом**. **Конъюгация** – процесс переноса ДНК от донорной к реципиентной клетке, осуществляющийся в результате прямого контакта между клетками бактерий. Реципиент, который при этом получает генетический материал от донора, называется **трансконъюгантом**. При **слиянии протопластов (сферопластов)** обмен генетической информацией осуществляется на уровне полных геномов двух родительских форм, индуцированных к слиянию. Получившаяся после реверсии клетка носит название **гибридной**.

Основными терминами, используемыми в генетике микроорганизмов, можно считать следующие. Термином «**штамм**» обозначают генетически однородную культуру определенного вида, полученную из одной клетки и отличающуюся от других штаммов происхождением и рядом признаков, несущественных для систематики. Такой штамм, выделенный из природного источника, называют **диким типом**. **Клон** – это генетически однородное потомство, полученное при размножении одной клетки у прокариот или вирусной частицы (у эукариотических микроорганизмов это потомство клетки или споры, делящееся митотически). На практике клоны получают из отдельных клеток, выращенных на поверхности плотной среды.

Способы генетического обмена наряду с процессами мутирования генов в отсутствие полового процесса у бактерий играют важную роль и обуславливают генетическую изменчивость, поставляющую материал для эволюции.

Для регистрации переноса хромосомных генов необходимо иметь бактерии с четко различающимися признаками, например неспособные синтезировать какие-либо факторы роста (ауксотрофные), резистентные к лекарственным препаратам и т. д.

Передача хромосомных маркеров при конъюгации бактерий (техника скрещивания бактерий)

При проведении экспериментов по конъюгации необходимо соблюдение некоторых условий, обеспечивающих образование трансконъюгантов с наибольшей эффективностью. Прежде всего следует использовать штаммы с генетическими маркерами, легко поддающимися отбору. Кроме того, подбирая штаммы для скрещивания, нужно помнить, что вследствие явления рестрикции зарегистрировать процесс передачи маркеров иногда бывает невозможно. Далее для обеспечения контакта между донорными и реципиентными клетками необходимо провести их смешивание либо в жидкой среде, либо на подложке, в качестве которой может выступать мембранный фильтр, помещенный на плотную питательную среду, или сама агаризованная среда.

В экспериментах по изучению кинетики конъюгационного переноса важно уметь остановить процесс конъюгации через точные интервалы времени и предотвратить его после высева на селективную среду. Простейшие способы достижения этого – использование механических встряхивателей либо реципиентного штамма, устойчивого к налидиксовой кислоте, в присутствии которой конъюгационный перенос ДНК немедленно блокируется. Важный фактор, на который следует обращать внимание при скрещивании бактерий, – температура. Анализируя возможность передачи признака конъюгативной плазмидой, целесообразно сопоставить протекание этого процесса при 37 и 25 °С.

При скрещивании бактерий двух штаммов *Escherichia coli* (донор: *E.coli* K-12 HfrH pro⁺ trp⁺ his⁺ thi⁻ str-s, реципиент: *E.coli* K-12 J 62 pro⁻ trp⁻ his⁻ thi⁺ str-r) культуры донорных и реципиентных бактерий в логарифмической стадии роста смешивают в соотношении 1 : 2 и инкубируют при 37 °С в течение 1 ч. После скрещивания конъюгационную смесь высевают петлей (или наносят по 10 мкл) на следующие типы селективных сред:

- минимальная глюкозо-солевая среда + триптофан + гистидин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор Pro⁺-рекомбинантов);
- минимальная глюкозо-солевая среда + триптофан + пролин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор His⁺-рекомбинантов);
- минимальная глюкозо-солевая среда + пролин + гистидин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор Trp⁺-рекомбинантов).

Кроме того, на эти же среды высевают клетки донорных и реципиентных бактерий, чтобы убедиться в их неспособности расти на селективных средах (рис. 14).

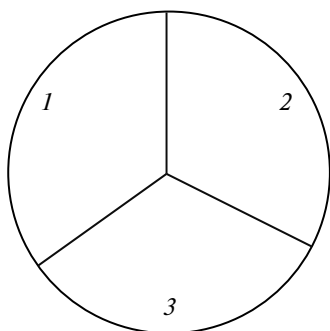


Рис. 14. Схема посева родительских и рекомбинантных клеток (конъюгационная смесь) на селективные среды:
 1 – высев клеток донора; 2 – высев клеток реципиента;
 3 – высев конъюгационной смеси

Поскольку контрселекцию («удаление») донорных клеток проводят стрептомицином, необходимо проверить рост родительских бактерий на среде со стрептомицином. Для этого клетки донорных и реципиентных штаммов высевают бактериологической петлей на агаризованную полноценную питательную среду со стрептомицином (200 мкг/мл).

Чашки помещают в термостат при температуре 37 °С на 48 ч. После этого учитывают результаты по наличию роста. Эффективность конъюгационного процесса оценивают по частоте формирования рекомбинантов по определенным маркерам. **Частота переноса маркера** – это отношение количества полученных рекомбинантных клеток по анализируемому маркеру к количеству клеток донора. Для подсчета количества рекомбинантных клеток делают разведения конъюгационной смеси и из соответствующих разведений производят высевы на селективные среды чашечным методом Коха. Количество клеток донора определяют при высевах на среды, не поддерживающие рост клеток реципиента.

Задания

1. Выявите модификационный характер продукции пигмента клетками *Serratia marcescens*.

2. Проведите скрещивание бактерий в жидкой питательной среде с последующим рассевом на селективные среды для определения образования рекомбинантного потомства.

3. Заполните табл. 12.

4. Решите задачу. При скрещивании донорного и реципиентного штаммов бактерий *Escherichia coli*, имеющих фенотипы (донор –

E.coli C leu⁻ his⁻ и реципиент – *E.coli* JCI1 pro⁻ arg⁻ Km₁₀₀), определите типы селективных сред:

- а) для отбора прототрофных клеток; в) подсчета клеток донора;
 б) отбора разных типов рекомбинантов; г) подсчета клеток реципиента.

Все ли образующиеся трансконъюганты будут иметь одинаковый генотип?

Определите частоту конъюгации, если известно, что количество клеток донора было 5×10^7 , реципиента 1×10^8 , а число сформировавшихся трансконъюгантов по отбираемому маркеру 5×10^2 .

Таблица 12

Сравнительный анализ способов генетического обмена у бактерий

Характеристика или свойство	Трансформация	Конъюгация	Трансдукция
Когда и кем был открыт процесс			
Определение понятия (термина); на примере каких бактерий открыт процесс			
Виды (типы) данного процесса			
Размер переносимого фрагмента ДНК			
Тип рекомбинации перенесенного фрагмента с ДНК реципиента			
Возможен ли процесс с участием транспозонов?			
Какой способ генетического обмена является основным фактором изменчивости бактерий?			
Условия осуществления процесса			

КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

1. ТЕКУЩИЙ КОНТРОЛЬ УСВОЕНИЯ МАТЕРИАЛА ПО ОСНОВНЫМ РАЗДЕЛАМ КУРСА «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Тема: Анатомия бактериальной клетки

1. Химический состав, строение и функции клеточной стенки бактерий. Отличия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий.
2. Техника и механизм окраски бактерий по методу Грама.
3. Бактериальные протопласты и сферопласты. Методы получения, свойства, использование. *L*-формы бактерий и их характеристика.
4. Химический состав, организация и функции поверхностных структур бактериальной клетки (капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки).
5. Методы выявления бактериальных капсул.
6. Цитоплазматическая мембрана бактерий. Химическая природа, строение и функции. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембраны и их функции.
7. Цитоплазма бактерий. Химический состав и организация. Внутритоплазматические включения, их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции.
8. Выявление резервных веществ бактериальной клетки.
9. Ядерный аппарат бактериальной клетки. Его химическая и структурная организация, функции. Репликация ДНК.
10. Органеллы движения микроорганизмов. Строение и функционирование бактериальных жгутиков. Другие типы движения у бактерий.
11. Методы изучения подвижности бактериальных клеток. Методы выявления бактериальных жгутиков и техника их окраски.

12. Строение, химический состав и особенности бактериальных эндоспор. Цитология и биохимия процесса спорообразования. Практическое значение. Другие покоящиеся формы бактерий.

13. Методы выявления бактериальных эндоспор.

14. Микроскопические методы исследования в микробиологии.

15. Методы прижизненного изучения микроорганизмов.

16. Простые и сложные методы окраски бактериальных клеток и их назначение.

Т е м а: Метаболизм бактерий

1. Метаболизм бактерий. Виды и основные назначения метаболических реакций, общая характеристика и особенности.

2. Энергетический метаболизм бактериальной клетки. Характеристика типов энергетического метаболизма.

3. Аэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи.

4. Нитратное дыхание. Распространение и роль денитрифицирующих бактерий в природе.

5. Сульфатное дыхание. Биологические особенности, распространение и значение сульфатовосстанавливающих бактерий.

6. Карбонатное дыхание. Биологические особенности, экология и роль в природе метанобразующих бактерий.

7. Спиртовое брожение. Энергетический выход спиртового брожения.

8. Маслянокислое брожение: химизм и практическое использование.

9. Типы молочнокислого брожения. Использование молочнокислых бактерий.

10. Пропионовокислое брожение. Пути образования пропионовой кислоты у прокариот.

11. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение.

12. Биосинтез аминокислот бактериями: основные предшественники и пути биосинтеза.

13. Биосинтез нуклеотидов бактериями.

14. Биосинтез жирных кислот и фосфолипидов бактериями.

15. Питание бактериальной клетки. Химические вещества как питательные субстраты. Физиологические группы питания бактерий.

Т е м а: Генетика бактерий

1. Изменчивость бактерий. Доказательства мутационной природы изменения наследственных признаков у бактерий. Понятие об адаптации у микроорганизмов.

2. Мутации у бактерий. Классификация мутаций и молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы. Практическое использование мутаций.

3. Общая характеристика способов генетического обмена у бактерий. Практическое использование.

4. Бактериальная трансформация: открытие, механизм, стадии трансформации. Компетентность реципиентных клеток и ее природа. Практическое значение трансформации.

5. Бактериальная конъюгация: открытие, механизм, основные особенности как способа обмена генетической информацией. Стадии конъюгации. Практическое использование.

6. Донорные и реципиентные бактерии и их характеристика. Половой фактор *E.coli*, его организация и функции.

7. Типы бактерий-доноров. Механизм их образования и основные отличия. Особенности потомства, возникающего при скрещивании с использованием доноров различного типа. Феномен сексдукции.

8. Бактериальная трансдукция: открытие и механизм. Типы трансдукции. Использование трансдукции в практических целях. Отличие трансдукции от фаговой конверсии.

9. Плазмиды бактериальных клеток: природа, организация, особенности и функции. Классификация плазмид. Значение внехромосомных генетических элементов для бактериальной клетки.

10. Мигрирующие генетические элементы бактерий (IS-элементы, транспозоны и фаги-транспозоны).

11. Системы рестрикции и модификации бактериальной клетки: выявление, механизм, значение для клетки. Классы ферментов рестриктаз. Практическое использование.

12. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках микроорганизмов. Успехи и перспективы генетической инженерии.

13. Репарация повреждений ДНК у бактерий.

14. Регуляция биохимической активности бактериальной клетки.

15. Оперонный принцип организации бактериальных хромосом. Лактозный оперон кишечной палочки и механизм его функционирования. Катаболитная репрессия.

16. Механизм функционирования репрессибельных оперонов.

2. ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕХНИКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель данного занятия – определение способности применять полученные знания и освоенные методические приемы работы с микроорганизмами для характеристики и описания физиолого-биохимических

свойств некоторых бактериальных культур без использования дополнительной литературы.

Необходимо:

1. Описать морфологию колоний предложенной культуры бактерий.
2. Определить принадлежность данной культуры к грамположительному или грамотрицательному типу.
3. Определить наличие спор у данных бактерий.
4. Определить наличие каталазной, протеолитической, сахаролитической активности.
5. Определить образование индола, аммиака, сероводорода.
6. Составить таблицу и внести в нее полученные данные.

3. ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОМПЬЮТЕРНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ (приводится примерный перечень)

1. Укажите характерные особенности представителей семейства *Enterobacteriaceae*:

- 1) кислотоустойчивые;
- 2) хемолитоавтотрофы;
- 3) хемоорганогетеротрофы;
- 4) факультативные анаэробы;
- 5) продуцируют масляную кислоту;
- 6) не образуют эндоспор;
- 7) грамотрицательные.

- | | |
|---------------|---------------|
| А. 1, 3, 4, 7 | Г. 1, 3, 4, 6 |
| Б. 3, 4, 6, 7 | Д. 1, 2, 4, 7 |
| В. 2, 4, 5, 7 | |

2. К хемолитотрофным относятся:

- 1) денитрифицирующие бактерии;
- 2) железобактерии;
- 3) энтеробактерии;
- 4) водородные бактерии;
- 5) карбоксидобактерии;
- 6) сульфатредуцирующие бактерии.

- | | |
|---------------|---------------|
| А. 1, 2, 5, 6 | Г. 3, 4, 5, 6 |
| Б. 1, 2, 4, 6 | Д. 1, 4, 5, 6 |
| В. 2, 3, 5, 6 | Е. 2, 4, 5, 6 |

3. Укажите свойства цианобактерий:

- 1) грамотрицательные;
- 2) осуществляют аноксигенный фотосинтез;
- 3) в клетках имеются фикобилисомы;
- 4) в клетках содержатся алифатические каротиноиды;
- 5) в клетках содержится хлорофилл *a*;
- 6) в клетках содержатся хлорофиллы *a* и *v*.

- А. 2, 4, 6 Г. 1, 3, 6
Б. 1, 2, 6 Д. 3, 4, 6
В. 1, 3, 5

4. Какие из перечисленных родов относятся к семейству *Spirochaetaceae*?

- 1) *Leptonema*;
- 2) *Desulfotomaculum*;
- 3) *Borrelia*;
- 4) *Cristispira*;
- 5) *Thiobacillus*;
- 6) *Polyangium*.

- А. 1, 2, 3 Г. 2, 5, 6
Б. 2, 3, 4 Д. 3, 5, 6
В. 1, 3, 4

5. Какие свойства из перечисленных характерны для миксобактерий?

- 1) грамотрицательные;
- 2) образуют плодовые тела;
- 3) передвигаются с помощью жгутиков;
- 4) способны к образованию покоящихся форм;
- 5) строгие анаэробы;
- 6) могут быть хищниками в отношении других бактерий;
- 7) метаболизм бродильный.

- А. 1, 2, 5, 7 Г. 3, 4, 6, 7
Б. 1, 3, 5, 7 Д. 4, 5, 6, 7
В. 1, 2, 4, 6

6. Леггемоглобин – это:

- 1) продукт симбиоза клубеньковых бактерий и бобовых растений;
- 2) зеленый пигмент;
- 3) вещество, предохраняющее фермент нитрогеназу от токсического действия молекулярного кислорода;

4) фитогормон, индуцирующий пролиферацию растительных клеток;

5) гликопротеин, специфически связывающий полисахариды.

А. 2, 3 Г. 1, 2

Б. 1, 4 Д. 1, 3

В. 1, 5

7. Предшественником для биосинтеза пролина является:

А. Пировиноградная кислота

Б. α -Кетоглутаровая кислота

В. 3-Фосфолицериновая кислота

Г. Щавелевоуксусная кислота

Д. Фосфоенолпировиноградная кислота

8. К хемоорганогетеротрофам относятся бактерии:

1) *Enterococcus faecalis*;

2) *Thiobacillus ferrooxidans*;

3) *Escherichia coli*;

4) *Lactobacillus bulgaricus*;

5) *Beggiatoa gigantea*.

А. 1, 2, 3 Г. 3, 4, 5

Б. 2, 3, 4 Д. 2, 3, 5

В. 1, 3, 4

9. Какие из перечисленных структур обычно имеются в бактериальных клетках?

1) ядерная мембрана;

5) лизосомы;

2) полупроницаемая мембрана;

6) нуклеоид;

3) митохондрии;

7) хлоропласты.

4) рибосомы;

А. 1, 5, 6 Г. 2, 6

Б. 4, 5 Д. 5, 6, 7

В. 2, 4, 6 Е. 2, 3, 6

**10. Какие из перечисленных бактерий обладают окислительно-бро-
дильным типом метаболизма?**

А. Анаэробы

Б. Аэробы

В. Строгие анаэробы

Г. Строгие аэробы

Д. Факультативные анаэробы

11. Какие из перечисленных бактерий осуществляют бутандиоловое брожение?

- 1) *Proteus vulgaris*;
- 2) *Pectobacterium carotovorum*;
- 3) *Enterobacter aerogenes*;
- 4) *Yersinia pestis*;
- 5) *Serratia marcescens*;
- 6) *Klebsiella pneumoniae*;
- 7) *Shigella dysenteriae*.

- | | |
|---------------|---------------|
| А. 1, 2, 3, 4 | Г. 3, 5, 6, 7 |
| Б. 2, 3, 4, 6 | Д. 2, 3, 5, 6 |
| В. 1, 2, 3, 5 | |

12. Сколько молекул АТФ образуется при аэробном дыхании у бактерий *Escherichia coli* из одной молекулы глюкозы, окисляемой гликолитическим путем?

- | | |
|-------|-------|
| А. 38 | Г. 34 |
| Б. 28 | Д. 30 |
| В. 26 | |

13. Какие из перечисленных свойств характерны для сульфатредуцирующих бактерий?

- 1) строгие анаэробы;
- 2) факультативные анаэробы;
- 3) цикл Кребса «разорван» или отсутствует;
- 4) терминальный переносчик электронтранспортной цепи цитохромоксидаза;
- 5) восстанавливают сульфаты в сульфиды;
- 6) содержат в клеточной стенке псевдомуреин.

- | | |
|------------|------------|
| А. 1, 3, 6 | Г. 2, 5, 6 |
| Б. 1, 4, 5 | Д. 1, 3, 5 |
| В. 2, 4, 6 | Е. 1, 5, 6 |

14. Анаэробное дыхание осуществляют бактерии:

- 1) метаногенные;
- 2) водородные;
- 3) сульфатредуцирующие;
- 4) денитрифицирующие;
- 5) нитрифицирующие;
- 6) аммонифицирующие.

- А. 1, 3, 4 Г. 2, 3, 5
Б. 1, 5 Д. 2, 6
В. 5,6

15. Заслуга Роберта Коха в развитии микробиологии состоит в том, что он:

- 1) показал, что процессы гниения и брожения обуславливаются жизнедеятельностью микроорганизмов;
- 2) открыл возбудителей сибирской язвы и туберкулеза;
- 3) разработал методы окрашивания микроорганизмов и методы микроскопического их изучения;
- 4) разработал метод накопительных культур микроорганизмов;
- 5) ввел в микробиологическую практику плотные питательные среды.

- А. 3, 4, 5 Г. 3, 4
Б. 1, 2, 3 Д. 1, 2
В. 2, 3, 5

16. Трансдукция была открыта в 1952 г. на бактериях:

- А. *Escherichia coli*
Б. *Streptococcus pneumoniae*
В. *Salmonella typhimurium*
Г. *Bacillus subtilis*
Д. *Pseudomonas aeruginosa*

17. Какой тип брожения является наиболее выгодным с энергетической точки зрения?

- А. Гомоферментативное молочнокислое брожение
Б. Пропионовокислое брожение
В. Маслянокислое брожение
Г. Бутандиоловое брожение
Д. Спиртовое брожение

18. Сколько молекул АТФ образуется при окислении одной молекулы НАДН в дыхательной цепи бактерий *E.coli*?

- А. 3 В. 1
Б. 2 Г. Нет верного ответа

19. Какие из перечисленных видов бактерий являются санитарным показателем загрязнения внешней среды?

- 1) *Escherichia coli*;
- 2) *Bacillus cereus*;

- 3) *Enterococcus faecalis*;
- 4) *Pseudomonas aeruginosa*;
- 5) *Clostridium tetani*.

А. 1, 5 В. 3, 4
 Б. 1, 3 Г. 1, 2

20. Для каких видов бактерий характерно наличие не кольцевых, а линейных хромосом?

- 1) *Rhodococcus fascians*;
- 2) *Bacillus anthracis*;
- 3) *Treponema pallidum*;
- 4) *Borrelia burgdorferi*.

А. 2, 3 В. 1, 4
 Б. 1, 3, 4 Г. 2, 4

21. Какое из перечисленных веществ является промежуточным продуктом биосинтеза всех ароматических аминокислот?

- А. α -Кетоглутаровая кислота
- Б. Фосфоенолпировиноградная кислота
- В. Префеновая кислота
- Г. Хоризмовая кислота
- Д. Прокатеховая кислота

22. Атомы водорода в электронтранспортной цепи дрожжей переносят:

- 1) хиноны;
- 2) цитохромы;
- 3) флавопротеины;
- 4) железосерные белки;
- 5) сукцинатдегидрогеназы.

А. 2, 4, 5 Г. 1, 3, 5
 Б. 3, 4, 5 Д. 1, 3, 4
 В. 1, 2, 3

23. Сколько молекул CO_2 выделяется при бутандиоловом брожении?

А. 1 В. 2
 Б. 3 Г. 4

24. Промискуитетными называют плазмиды, которые:

- А. Имеют ограниченный круг клеток-хозяев
- Б. Имеют ослабленный контроль репликации
- В. Имеют малые размеры

- Г. Имеют широкий круг клеток-хозяев
- Д. Не имеют *tra*-области

25. Какие из перечисленных признаков характерны для генерализованной трансдукции?

- 1) может трансдуцироваться любой бактериальный ген примерно с одинаково высокой частотой;
- 2) могут переноситься строго определенные фрагменты ДНК;
- 3) бактериофаг является только переносчиком генетического материала;
- 4) бактериофаг лизогенизирует бактерии-реципиенты;
- 5) трансдуцирующие дефектные фаги содержат в головках только фрагменты бактериальной ДНК.

- А. 2, 3, 5
- Б. 1, 4, 5
- В. 1, 2, 3
- Г. 1, 3, 5
- Д. 3, 4, 5
- Е. 2, 3, 4

26. Какие из перечисленных бактерий находятся в состоянии компетентности в любую фазу роста?

- 1) менингококки;
- 2) стафилококки;
- 3) гемофильные бактерии;
- 4) гонококки;
- 5) сенная палочка.

- А. 2, 4
- Б. 3, 5
- В. 2, 5
- Г. 1, 2
- Д. 1, 3
- Е. 1, 4

27. Внутрицитоплазматические включения бактерий окружены:

- А. Цитоплазматической мембраной
- Б. Капсулой
- В. Белковой мембраной
- Г. Слоем липидов

28. В основе маслянокислого брожения, осуществляемого бактериями рода *Clostridium*, лежит:

- А. Путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса
- Б. Гексозомонофосфатный путь
- В. Путь Энтнера – Дудорова
- Г. Путь Варбурга – Диккенса – Хореккера

29. Значение IS-элементов состоит в том, что они:

- А. Участвуют в объединении трансмиссивных и нетрансмиссивных плазмид
- Б. Могут являться носителями «блуждающих» промоторов
- В. Вызывают инверсии
- Г. Играют важную роль в эволюции бактерий
- Д. А+Б+В+Г

30. Плазмиды со строгим контролем репликации – это:

- 1) малокопийные плазмиды;
 - 2) мультикопийные плазмиды;
 - 3) плазмиды, реплицирующие синхронно с бактериальной хромосомой;
 - 4) молекулы ДНК, использующие для репликации ДНК-полимеразу I;
 - 5) репликоны, удваивающиеся с помощью ДНК-полимеразы III;
 - 6) плазмиды с молекулярной массой более 20 МД.
- А. 2, 4, 6 Г. 3, 5, 6
Б. 1, 4, 6 Д. 1, 3, 5, 6
В. 1, 3, 4, 6 Е. 2, 3, 5

31. Инфекционной формой хламидий являются:

- А. Ретикулярные тельца
- Б. Элементарные тельца
- В. Инициальные тельца
- Г. Промежуточные тельца
- Д. Вегетативные формы

32. Укажите свойства, характерные для гелиобактерий:

- 1) осуществляют оксигенный фотосинтез;
 - 2) клетки содержат бактериохлорофилл g и небольшое количество каротиноидов;
 - 3) факультативные фототрофы;
 - 4) фиксация CO₂ осуществляется в цикле Арнона;
 - 5) рост возможен только на свету в анаэробных условиях;
 - 6) осуществляют бескислородный тип фотосинтеза;
 - 7) грамположительные.
- А. 1, 2, 4, 5 Г. 1, 3, 4, 5
Б. 1, 2, 3, 4 Д. 2, 3, 6, 7
В. 2, 5, 6, 7 Е. 2, 4, 6, 7

33. Общее количество клеток микроорганизмов в суспензии можно определить, используя следующие методы:

- 1) нефелометрический;
- 2) чашечный метод Коха;
- 3) подсчет клеток в камере Горяева — Тома;
- 4) подсчет клеток на мембранных фильтрах;
- 5) посев в агаризованную среду;
- 6) подсчет клеток при помощи люминесцентной микроскопии.

- | | |
|---------------|---------------|
| А. 1, 3, 4, 6 | Г. 2, 4, 5, 6 |
| Б. 1, 2, 5, 6 | Д. 3, 4, 5, 6 |
| В. 1, 3, 6 | Е. 3, 4, 5 |

34. Выберите верные утверждения:

1) денитрифицирующие бактерии относятся к факультативным анаэробам;

2) фермент супероксиддисмутазы не обеспечивает аэробным микроорганизмам защиту от токсичного действия активных форм кислорода;

3) удельная скорость роста различна для разных штаммов одного и того же вида;

4) урожай бактериальной культуры не зависит от условий культивирования;

5) продукты вторичного метаболизма микроорганизмов чаще всего накапливаются в стационарной фазе роста;

6) агар-агар получают из бурых морских водорослей.

- | | |
|---------------|------------|
| А. 1, 2, 5, 6 | Г. 4, 5, 6 |
| Б. 1, 5, 6 | Д. 3, 4, 5 |
| В. 2, 3, 5 | Е. 1, 3, 5 |

35. Какие из перечисленных свойств характерны для рестриктаз III типа?

1) обладают как рестриктазной, так и метилазной активностью;

2) для специфического действия нужны только ионы Mg^{2+} ;

3) гидролизуют ДНК на расстоянии 20–39 нуклеотидных пар от сайтов узнавания;

4) состоят из двух различных субъединиц;

5) сайты узнавания и места рестрикции совпадают;

6) состоят из двух субъединиц одного типа.

- | | |
|------------|------------|
| А. 1, 2, 4 | Г. 2, 3, 6 |
| Б. 1, 5, 6 | Д. 1, 4, 3 |
| В. 2, 4, 5 | Е. 2, 3, 4 |

ПЕРЕЧЕНЬ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

Возбудители заболеваний у человека и животных

1. *Corynebacterium diphtheriae* – дифтерия.
2. *Mycobacterium tuberculosis* – туберкулез человека.
3. *Mycobacterium leprae* – проказа.
4. *Mycobacterium bovis* – туберкулез крупного рогатого скота.
5. *Treponema pallidum* – сифилис.
6. *Clostridium tetani* – столбняк.
7. *Clostridium botulinum* – ботулизм.
8. *Clostridium perfringens* – газовая гангрена.
9. *Clostridium histolyticum* – газовая гангрена.
10. *Clostridium septicum* – газовая гангрена.
11. *Clostridium novyi* – газовая гангрена.
12. *Salmonella typhi* – брюшной тиф.
13. *Shigella dysenteriae* – бактериальная дизентерия.
14. *Bordetella pertussis* – коклюш.
15. *Neisseria gonorrhoeae* (гонококк) – гонорея.
16. *Neisseria meningitidis* (менингококк) – менингит.
17. *Vibrio cholerae* – холера.
18. *Rickettsia rickettsii* – пятнистая лихорадка Скалистых гор.
19. *Rickettsia prowazekii* – эпидемический сыпной тиф.
20. *Rickettsia typhi* – эндемический или крысиный сыпной тиф.
21. *Streptococcus pneumoniae* – бактериальная пневмония, бронхит, трахеит, отит, гайморит, ангина.
22. *Streptococcus pyogenes* – фарингит, скарлатина, абсцессы при раневых инфекциях, рожистые воспаления.
23. *Bacillus anthracis* – сибирская язва крупного рогатого скота, которая передается людям.
24. *Bacillus thuringiensis* – паралитическое заболевание гусениц, чешуекрылых насекомых.
25. *Borrelia recurrentis* – эпидемический возвратный тиф или возвратная лихорадка.
26. *Borrelia burgdorferi* – болезнь Лайма.
27. *Borrelia garinii* – болезнь Лайма.
28. *Borrelia afzelii* – болезнь Лайма.
29. *Pseudomonas aeruginosa* – гнойные инфекции, отиты наружного уха, эндокардиты, энтериты, пневмония, инфекции мочевыводящих путей, артриты, остеомиелиты.
30. *Burkholderia mallei* – сап лошадей.
31. *Burkholderia cepacia* – циститы.
32. *Klebsiella pneumoniae* – пневмония, бактериемия, инфекции мочевыводящих путей, диарея у новорожденных.
33. *Yersinia pestis* – бубонная или легочная чума.

34. *Dermatophilus congolensis* – дерматоз у овец и лошадей.
35. *Staphylococcus aureus* – фурункулез, пневмония, эндокардиты, артриты, остеомиелиты, пищевые токсикоинфекции.
36. *Chlamydia trachomatis* – урогенитальный хламидиоз, венерическая лимфогранулема.
37. *Legionella pneumophila* – легионеллез («болезнь легионеров», или тяжелая пневмония).
38. *Mycoplasma pneumoniae* – пневмония.
39. *Helicobacter pylori* – гастрит, язва и рак желудка.

Возбудители бактериозов у растений

1. *Streptomyces scabies* – парша картофеля.
2. *Pectobacterium carotovorum* – «мягкие» или «мокрые» гнили.
3. *Erwinia amylovora* – бактериальный ожог листьев плодовых.
4. *Xanthomonas campestris* – черная гниль крестоцветных.
5. *Agrobacterium tumefaciens* – корончатый гал.
6. *Pseudomonas syringae* – некрозы листьев плодовых.
7. *Ralstonia solanacearum* – кольцевая гниль картофеля.
8. *Clavibacter michiganensis* – бактериальный рак томатов.

ПРОГРАММА КУРСА «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Введение

Предмет и задачи микробиологии. Связь микробиологии с другими биологическими науками. Открытие микроорганизмов А. ванн Левенгуком. Роль Л. Пастера и Р. Коха в формировании микробиологии как науки. Значение работ И. И. Мечникова, Л. С. Ценковского, Н. Ф. Гамалеи, С. Н. Виноградского, В. Л. Омелянского, Д. И. Ивановского, М. Бейеринка, А. Клейвера, К. ванн Ниля, О. Эвери, К. Мак-Леода, К. Мак-Карти, Г. А. Надсона, Дж. Бидла, Э. Татума, Дж. Ледерберга, Н. Циндера, А. Флеминга. Основные направления развития современной микробиологии. Значение микробиологии для народного хозяйства и здравоохранения.

Микроорганизмы и их классификация

Положение микроорганизмов в системе живого мира. Разнообразие микроорганизмов и их общность с другими организмами. Прокариотические и эукариотические микроорганизмы; сходство и основные различия.

Вирусы: общая характеристика, отличия от клеточных организмов жизни. Бактериофаги: свойства, химический состав, строение, распространение в природе. Вирулентные и умеренные бактериофаги; особенности взаимодействия с бактериальными клетками. Фаговая конверсия.

Морфология и структурная организация бактериальной клетки

Морфология и размеры бактерий. Плеоморфизм бактерий.

Анатомия бактериальной клетки. Роль различных химических соединений в формировании клеточных структур и функционировании бактерий.

Химический состав, строение и функции клеточной стенки бактерий. Различия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий. Бактериальные сферопласты и протопласты: методы получения, свойства, применение. L-формы бактерий и их характеристика.

Химический состав, организация и функции поверхностных структур бактериальной клетки (капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки).

Цитоплазматическая мембрана бактерий: химическая природа, строение и функции. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембраны и их функции.

Цитоплазма бактерий; химический состав и организация. Внутрицитоплазматические включения; их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции.

Нуклеоид бактериальной клетки: химическая и структурная организация, функции. Репликация ДНК у бактерий. Концепция репликона. Регуляция клеточного деления.

Органеллы движения бактерий. Строение, расположение на клетке и функционирование бактериальных жгутиков. Движение спирохет и бактерий со скользящим типом передвижения.

Строение, химический состав и свойства бактериальных эндоспор. Цитология и биохимия процесса спорообразования. Практическое значение спорообразования. Другие покоящиеся формы бактерий.

Типы размножения бактерий.

Неокрашенные (нативные) и окрашенные препараты бактерий: техника приготовления и назначение. Техника окраски бактериальных жгутиков. Техника и механизм окраски бактерий по методу Грама. Техника и механизм окраски кислотоустойчивых бактерий. Методы выявления бактериальных эндоспор, капсул, резервных веществ, нуклеоида. Методы изучения подвижности бактерий.

Культивирование и рост бактерий

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

Накопительные культуры; методы их получения. Чистые культуры микроорганизмов; методы их получения.

Рост клетки и бактериальной популяции. Сбалансированный и несбалансированный рост. Основные параметры роста культур: время генерации, удельная скорость роста, выход биомассы, экономический коэффициент. Закономерности роста чистых культур при периодическом выращивании. Кривая роста, характеристика отдельных фаз. Рост микроорганизмов при непрерывном культивировании. Синхронные

культуры, способы их получения и значение. Культивирование иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Методы количественного учета микроорганизмов. Методы поддержания (хранения) культур микроорганизмов.

Действие физических и химических факторов на жизнедеятельность бактерий

Действие факторов физической природы на жизнедеятельность микроорганизмов. Характер и механизмы действия химических веществ на жизнедеятельность микроорганизмов. Репарация поврежденных ДНК у микроорганизмов (фотореактивация, эксцизионная и рекомбинационная репарации, SOS-ответ). Молекулярные механизмы репарационных процессов. Практическое использование химических и физических факторов. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике. Методы определения чувствительности бактерий к УФ-облучению.

Антибиотики; их природа и механизм действия на бактериальную клетку. Использование антибиотиков в практических целях. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Питание микроорганизмов. Фототрофы и хемотрофы. Автотрофы и гетеротрофы. Химические вещества как питательные субстраты. Ферментативное оснащение микроорганизмов, обеспечивающее утилизацию питательных веществ. Конститутивные и индуцибельные ферменты. Экзо- и эндоферменты. Определение ферментативной активности микроорганизмов. Факторы роста бактериальной клетки. Ауксотрофы и прототрофы. Физиологические группы питания бактерий. Сапрофиты и паразиты.

Метаболизм бактерий

Виды и основные назначения метаболических реакций у бактерий, общая характеристика и особенности.

Энергетический метаболизм. Источники энергии у микроорганизмов. Хемосинтез и фотосинтез. Способы синтеза АТФ у микроорганизмов. Пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов. Энергетический выход различных путей катаболизма глюкозы. Характеристика типов энергетического метаболизма. Аэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи бактерий и дрожжей. Анаэробное дыхание. Доноры и акцепторы электронов, используемые разными микроорганизмами при анаэроб-

ном дыхании. Нитратное дыхание. Распространение и роль денитрифицирующих бактерий в природе. Сульфатное дыхание. Биологические свойства, распространение и значение сульфатовосстанавливающих бактерий. Карбонатное дыхание. Биологические свойства, экология и роль в природе метаногенных бактерий. Фумаратное дыхание. Сукциногенные бактерии. Брожение. Пути сбраживания углеводов и других соединений. Спиртовое и маслянокислое брожение; химизм и практическое использование. Молочнокислое гомо- и гетероферментативное брожение. Пропионовокислое брожение; пути образования пропионовой кислоты у прокариот. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение.

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

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

Генетика бактерий

Изменчивость микроорганизмов. Доказательства мутационной природы изменения наследственных признаков у бактерий. Понятие об адаптации микроорганизмов. Модификационная изменчивость у бактерий. Мутации у бактерий. Классификация мутаций и молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы. Практическое использование мутаций. Методы выделения мутантов бактерий.

Характеристика способов генетического обмена у бактерий. Бактериальная трансформация. Открытие, механизм, стадии трансформации. Компетентность реципиентных клеток при трансформации и ее природа. Практическое значение трансформации. Бактериальная конъюгация; открытие, механизм, основные особенности как способа обмена генетической информацией. Стадии конъюгации. Практическое значение конъюгации. Донорные и реципиентные бактерии и их характеристика. Половой фактор *E. coli*; его организация и функции. Типы бактерий-доноров; механизмы их образования и основные отличия. Особенности потомства, образующегося в скрещиваниях с использованием различных доноров. Феномен сексдукции. Бактериальная трансдукция; открытие, механизм и особенности. Типы трансдукции. Использование трансдукции в практических целях. Отличие трансдукции от фаговой конверсии.

Техника скрещивания бактерий. Принципы отбора рекомбинантов.

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

Мигрирующие генетические элементы бактерий (*IS*-элементы, транспозоны, фаги-транспозоны).

Системы рестрикции и модификации бактериальной клетки: обнаружение, механизм, значение для клетки. Типы ферментов рестриктаз.

Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках микроорганизмов. Успехи и перспективы генетической инженерии.

Регуляция метаболизма бактерий

Регуляция активности ферментов у бактерий. Ретроингибирование. Мультивалентное, кумулятивное и последовательное ингибирование активности ферментов. Регуляция синтеза ферментов у бактерий. Оперонный принцип организации бактериальных хромосом. Индукцибельные опероны и механизмы их функционирования. Катаболитная репрессия. Диауксия. Механизмы функционирования репрессибельных оперонов. Атенуация.

Взаимоотношения микроорганизмов с микро- и макроорганизмами

Формы взаимоотношений между микроорганизмами и факторы, их определяющие. Симбиотические и конкурентные взаимоотношения. Бактериоцины; химическая природа и свойства. Значение бактериоцинов для бактерий. Практическое использование бактериоциногенных штаммов. Методы изучения микробного антагонизма. Выявление бактериоциногенной активности.

Взаимоотношения микроорганизмов с высшими растениями и животными. Типы взаимоотношений, примеры. Нормальная микрофлора человека, ее представители и значение для организма. Дисбактериоз. Эпифитная и ризосферная микрофлора растений. Микроорганизмы, патогенные для человека, животных и растений, и факторы их вирулентности. Инвазивность, агрессивность, токсигенность. Бактериальные токсины, их классификация, химическая природа и свойства. Механизм токсинообразования. Действие токсинов на восприимчивый организм.

Систематика и основные группы бактерий

Принципы систематики бактерий. Классификация, номенклатура и идентификация бактерий. Генетические, фенотипические и сероло-

гические критерии систематики. Современная филогенетическая и фенотипическая классификация бактерий.

Принципы видовой идентификации микроорганизмов.

Фототрофные бактерии: систематика, биологические свойства, распространение в природе и значение. Характеристика цианобактерий, пурпурных и зеленых бактерий, гелиобактерий и прохлорофит.

Хемолитотрофные бактерии. Механизм окисления неорганических веществ хемолитотрофными бактериями. Нитрифицирующие бактерии. Процесс нитрификации и его роль в круговороте азота в природе. Бактерии, окисляющие неорганические соединения серы. Железобактерии. Водородные бактерии. Карбоксидобактерии.

Миксобактерии и цитофаги. Цикл развития миксобактерий с образованием плодовых тел.

Риккетсии и хламидии. Жизненный цикл развития хламидий внутри эукариотических клеток. Заболевания, вызываемые патогенными хламидиями и риккетсиями.

Спирохеты.

Псевдомонады; их биохимические особенности, роль в природе и практическое значение.

Свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы; их характеристика и роль в круговороте азота. Механизм фиксации молекулярного азота. Практическое использование азотфиксирующих микроорганизмов.

Группа молочнокислых бактерий; их физиолого-биохимические особенности, распространение в природе и практическое значение. Характеристика патогенных представителей молочнокислых бактерий.

Энтеробактерии; их систематика, характеристика и значение отдельных представителей для человека. Бактерии *E. coli* как санитарный показатель загрязнения внешней среды. Коли-титр и коли-индекс.

Пропионовокислые бактерии; их биологические свойства, практическое значение и распространение в природе.

Спорообразующие бактерии; их характеристика, практическое значение и распространение в природе.

Грамотрицательные кокки, входящие в семейство *Neisseriaceae*.

Коринеформные бактерии.

Микобактерии. Кислотоустойчивость микобактерий и факторы их вирулентности.

Актиномицеты; особенности структурной организации, систематика, физиолого-биохимические свойства, роль в природе, практическое использование.

Микоплазмы.

Метилотрофные бактерии. Облигатные и факультативные метилотрофы. Практическое применение метилотрофных бактерий.

Архебактерии. Отличие архебактерий от эубактерий. Характеристика групп архебактерий.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

- Гусев, М. В.* Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М. : Издат. центр «Академия», 2003.
- Лысак, В. В.* Микробиология / В. В. Лысак. Минск : БГУ, 2008.
- Лысак, В. В.* Физиология микроорганизмов / В. В. Лысак. Минск : Издат. центр БГУ, 2014.
- Шлегель, Г.* Общая микробиология / Г. Шлегель. М. : Мир, 1987.

Дополнительный

- Альберт, С. Б.* Молекулярная биология клетки : в 3 т. / С. Б. Альберт [и др.]. М. : Мир, 1994. Т. 1–3.
- Белясова, Н. А.* Микробиология / Н. А. Белясова. Минск : БГТУ, 2005.
- Брода, П.* Плазмиды / П. Брода. М. : Мир, 1982.
- Воробьева, Л. И.* Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М. : Высш. шк., 1989.
- Воробьева, Л. И.* Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. М. : Изд-во МГУ, 1995.
- Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М. : Мир, 2002.
- Готтшалк, Г.* Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк. М. : Мир, 1982.
- Громов, Б. В.* Строение бактерий / Б. В. Громов. Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1985.
- Дебабов, В. Г.* Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М. : Высш. шк., 1988.
- Заварзин, Г. А.* Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин. М. : Наука, 2004.
- Заварзин, Г. А.* Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. М. : Кн. дом «Университет», 2001.

Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов. М. : Высш. шк., 1989.

Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. М. : Дрофа, 2005.

Кондратьева, Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы / Е. Н. Кондратьева. М. : Изд-во МГУ, 1983.

Кондратьева, Е. Н. Фототрофные микроорганизмы / Е. Н. Кондратьева, И. В. Максимова, В. Д. Самуйлов. М. : Изд-во МГУ, 1989.

Коничев, А. С. Молекулярная биология / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. М. : Издат. центр «Академия», 2003.

Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. СПб. : СпецЛит, 2002.

Ланчини, Д. Антибиотики / Д. Ланчини, Ф. Паренти. М. : Мир, 1985.

Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. М. : Мир, 1987.

Лысак, В. В. Систематика микроорганизмов / В. В. Лысак, О. В. Фомина. Минск : БГУ, 2014.

Медицинская микробиология / под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева. М. : Гэотар Медицина, 1999.

Методы общей бактериологии : в 3 т. / Ф. Герхардт [и др.]; под ред. Ф. Герхардта. М. : Мир, 1983–1984. Т. 1–3.

Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. М. : Издат. центр «Академия», 2005.

Нетрусов, А. И. Экология микроорганизмов / А. И. Нетрусов [и др.]. М. : Издат. центр «Академия», 2004.

Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. М. : Мир, 1997. Т. 1–2.

Пехов, А. П. Основы плазмидологии / А. П. Пехов. М. : Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 1996.

Прозоров, А. А. Трансформация у бактерий / А. А. Прозоров. М. : Наука, 1988.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / М. Н. Пименова [и др.]; под ред. Н. С. Егорова. М. : МГУ, 1995.

Современная микробиология : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дресса, Г. Шлегеля. М. : Мир, 2005. Т. 1–2.

Стейниер, Р. Мир микробов : в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М. : Мир, 1979. Т. 1–3.

Стэнт, Г. Молекулярная генетика / Г. Стэнт, Р. Кэлиндар. М. : Мир, 1981.

Шлегель, Г. История микробиологии / Г. Шлегель. М. : Едиториал УРСС, 2002.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / ed.-in-chief G. M. Garrity. N. Y. : Springer, 2001–2003. Vol. 1–5.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Методическая часть	5
1. Оснащение микробиологической лаборатории и правила работы в ней	5
2. Питательные среды	6
3. Культивирование микроорганизмов.....	12
4. Методы стерилизации	16
5. Поддержание (хранение) культур микроорганизмов	21
6. Микроскопические методы исследования в микробиологии	24
7. Морфология бактерий. Структурная организация и химический состав бактериальной клетки	29
8. Выделение чистых культур микроорганизмов.....	40
9. Принципы видовой идентификации микроорганизмов. Изучение основных физиолого-биохимических свойств бактерий	49
10. Количественный учет микроорганизмов	56
11. Действие факторов внешней среды на микроорганизмы	66
12. Взаимоотношения между микроорганизмами	74
13. Наследственность и изменчивость бактерий	80
Контроль самостоятельной работы студентов	92
Программа курса «Микробиология»	106
Список литературы	113

Учебное издание

Лысак Владимир Васильевич
Желдакова Римма Анатольевна
Фомина Ольга Валентиновна

**МИКРОБИОЛОГИЯ.
ПРАКТИКУМ**

Пособие

Редактор *А. А. Федосеева*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Т. К. Раманович*
Компьютерная верстка *Ю. Г. Вержбицкой*
Корректоры *Н. Г. Баранова, Т. А. Беланко*

Подписано в печать 30.06.2015. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Ризография. Усл. печ. л. 6,74. Уч.-изд.л. 7,62. Тираж 250 экз. Заказ 523.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.