

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биологической химии

Н. А. Клёнова

## **ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ**

*Допущено Учебно-методическим объединением по классическому  
университетскому образованию в качестве учебного пособия для студентов  
высших учебных заведений, обучающихся по направлению 020400 (020200)  
«Биология»*

Самара  
Издательство «Самарский университет» 2012

УДК 576.8  
ББК 28.4  
К48

Рецензенты : д-р мед. наук, проф. И. И. Марков;  
д-р биол. наук, проф. Н. В. Прохорова

Отв. редактор канд. биол. наук, доц. Г. Л. Рытов

**Клёнова, Н. А.**

К48 Лабораторный практикум по микробиологии : учебное пособие /  
Н. А. Клёнова. - Самара : Изд-во «Самарский университет»,  
2012. - 102 с.  
ISBN 978-5-86465-553-5

Учебное пособие содержит разнообразный материал, предусмотренный в рамках освоения курса «Микробиология и вирусология»: краткие теоретические сведения; задания к лабораторным работам и алгоритм их выполнения, вопросы к коллоквиумам, рекомендуемую литературу. Иллюстрации пособия помогут студентам ориентироваться в выполнении и успешной сдаче лабораторных работ. В приложениях дается специальный материал в помощь лаборанту, готовящему лабораторное занятие: составы и приготовление питательных сред, подготовка посуды, реактивов и объектов изучения.

Предназначено для студентов-бакалавров и специалистов, обучающихся по направлению 020400 (020200) «Биология».

УДК 576.8  
ББК 28.4

*Все учебные пособия издательства «Самарский университет»  
размещены на сайте [weblib.ssu.samara.ru](http://weblib.ssu.samara.ru)*

ISBN 978-5-86465-553-5

© Клёнова Н. А., 2012  
© Самарский государственный  
университет, 2012  
© Оформление. Издательство  
«Самарский университет», 2012

*Светлой памяти старшего преподавателя  
кафедры биологической химии и моей сокурсницы  
Трещаниной Нинеллы Александровны  
посвящается*

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Курс «Микробиология и вирусология» является общим и обязательным для всех студентов, которые обучаются по специальности «биология». Лабораторный практикум составлен в соответствии с программами данного курса для бакалавров и специалистов. Знания и практические навыки работы с микроорганизмами требуются для освоения современного уровня развития биологических наук. Микроорганизмы - основные объекты биотехнологии, молекулярной биологии и генетики, а также постоянно сопровождают человека в окружающей среде и сожительствуют внутри его организма. Непосредственное знакомство с ними и освоение принципов микробиологических исследований позволит студентам не только повысить свой профессиональный уровень, но и приобрести знания и навыки, необходимые в обычной жизни человека.

Лабораторный практикум построен по этапам, предполагающим получение и закрепление приобретенных навыков и знаний работы с микробиологическими объектами. На первом этапе работы нацелены на освоение техники основных микробиологических манипуляций, знакомство с применяемым оборудованием и посудой, методами посевов, пересевов и культивирования. В дальнейшем студенты выполняют ряд более сложных работ по выделению и частичной идентификации выращенных самостоятельно (специалисты) или предоставленных лаборантом (бакалавры) культур микроорганизмов. Работа в микробиологической лаборатории требует неуклонного соблюдения правил техники безопасности, с которыми студентов знакомит преподаватель, как перед прохождением практикума, так и перед каждым конкретным занятием. Кроме того, студент должен понимать, что культуры микроорганизмов недолговечны и без определенных манипуляций по пересеву и хранению могут быстро погибнуть, а это делает дальнейшее выполнение практикума невозможным.

В описании каждого занятия присутствуют цель занятия, оборудование, реактивы и материалы; краткое изложение некоторых теоретических сведений, необходимых для выполнения работы; задания, которые должен выполнить студент. В нем представлены вопросы к коллоквиумам, предназначенным для проверки и закрепления теоретического курса по микробиологии и вирусологии.

Учебное пособие будет полезно также и для обслуживающего практикум лаборанта, студентов, выполняющих курсовые и квалификационные работы по микробиологии, так как содержит вспомогательные сведения: составы основных сред для культивирования микроорганизмов, приготовление красителей и объектов изучения.

## Часть I. ТЕХНИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Тема 1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Методы изучения и культивирования микроорганизмов

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения ряда правил техники безопасности и поведения. Техника выполнения лабораторных работ связана с использованием открытого огня горелок или спиртовок, представляющих прямую опасность для работающего и окружающих. Необходимость работы в области пламени горелок, в свою очередь, связана с соблюдением правил асептики для обеспечения стерильности и во избежание засорения культур микроорганизмов микробами из окружающей среды. Кроме того, при выделении из объектов окружающей среды могут быть обнаружены условно патогенные микроорганизмы, грибы, споры которых обладают аллергенностью.

Перед проведением лабораторных работ в помещении лаборатории проводится проветривание и влажная уборка для сокращения микробов в воздухе и на предметах, а также включаются ультрафиолетовые бактерицидные лампы на 30 минут. В связи со всем вышеизложенным студенты должны соблюдать следующие правила работы в микробиологической лаборатории.

1. В лабораторию нельзя приходить в верхней одежде; студент должен быть одет в чистый белый халат; длинные волосы аккуратно заколоты или собраны в пучок. В осенний период студент должен надевать бахилы или иметь сменную обувь.

2. Каждый студент занимает постоянное рабочее место и отвечает за его состояние.

3. На рабочем месте не должно быть никаких посторонних предметов: сумок, портфелей, пакетов. Для них предусмотрено специально отведенное место. Для выполнения работ требуются карандаши, линейка, ластик, маркеры по стеклу.

4. Для оформления и сдачи лабораторных работ необходимо иметь общую тетрадь (48 листов), где записывается номер занятия и его название. Дальнейшие записи на каждом занятии определяет преподаватель.

5. Все операции проводятся в соответствии с инструкцией преподавателя и описанием работы в практикуме.

6. В микробиологической лаборатории нельзя быстро двигаться, много и громко разговаривать, есть, пить, курить. Все исследования проводят аккуратно, четко, не отвлекаясь на посторонние дела.

7. В конце занятия необходимо убрать свое рабочее место, привести микроскоп в исходное состояние. Пробирки и чашки Петри с культурами, а также мазки убираются по указанию преподавателя.

**Занятие М1**  
**Правила работы с микроскопом.**  
**Особенности микрофотоирования в микробиологии**

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Знакомство с особенностями работы в микробиологической лаборатории и основными методами микрофотоирования. Освоение техники микрофотоирования постоянных препаратов на светопольном микроскопе.

Основным объектом изучения общей микробиологии являются бактерии, размеры которых в среднем составляют 2-5 мкм. Рассмотреть строение, морфологические особенности бактерий можно только при значительном увеличении. Многие детали строения прокариотических клеток можно изучить только с помощью электронного микроскопа, в световой микроскоп обычно видна форма клеток, характер их скоплений. При применении специальных методов окраски можно увидеть споры, различные включения, оценить подвижность клеток.

В студенческих микробиологических лабораториях для занятий используется *светопольная микроскопия*.

**Устройство светового микроскопа.** Наиболее распространенными микроскопами для студенческих микробиологических исследований являются микроскопы ВЮЛАМ типа С-11, МБИ-1; МБР-1 и др. Микроскоп С-11 изображен на **рис. 1**.



Рис. 1. Микроскоп С-11 с зеркалом. На предметном столике находится препарат, прижатый клеммами. На препарат наведен объектив 90х (иммерсионный)

*Механическая часть микроскопа.* К механической части микроскопа относятся: штатив, предметный столик и тубус. *Штатив* имеет основание и колонку (тубусодержатель). К нему примыкают механизмы для регуляции положения тубуса, которое изменяется с помощью *микрометрического и микрометрического винтов*.

*Макрометрический винт* служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта.

*Микрометрический винт* используют для четкой установки объекта в фокусе.

При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается вниз к объекту, против часовой стрелки - поднимается вверх от препарата.

*Предметный столик* необходим для размещения на нем препарата с объектом изучения. У некоторых микроскопов предметный столик может вращаться с помощью определенных винтов, расположенных сбоку. В центре столика находится отверстие для освещения препарата снизу светом от лампы осветителя. В столике имеются отверстия для клемм, предназначенных для закрепления препарата.

*Тубус* — трубка, в которую вставляется сверху окуляр. Снизу к тубусу прикрепляется *револьвер* (объективодержатель) с гнездами для объективов. Микроскоп обычно имеет винт, отпуск которого приводит в движение тубус, поворачивающийся вокруг своей оси.

*Оптическая часть микроскопа.* Состоит из основного оптического узла, включающего объективы и окуляр, и вспомогательной части - конденсора и осветителя. *Конденсор* состоит из 2-3 короткофокусных линз, собирающих лучи и направляющих их на объект. Конденсор особенно необходим при работе с иммерсионной системой. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре есть *ирисовая диафрагма*, состоящая из стальных серповидных пластинок.

*Объективы.* Объективы вкручены в револьвер и представляют собой наиболее важную часть микроскопа. Это многолинзовые короткофокусные системы, от качества которых зависит изображение объекта. В микроскопах ВИОЛАМ используются объективы с увеличением 8х; 40х и 90х. Объектив с увеличением 90х - *иммерсионный*. С ним можно работать, только используя иммерсионное масло, поэтому после работы он протирается спирт-эфирной смесью для удаления остатков иммерсионного масла.

Наружная линза объектива называется *фронтальной*. Именно она обеспечивает увеличение объекта. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива.

Остальные линзы служат для коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов. Наиболее значимыми недостатками являются дефекты *сферической и хроматической аберрации*. Причи-

ной сферической аберрации служит свойство линз неравномерно преломлять центральные и периферические лучи. Периферические лучи преломляются в большей степени и пересекаются на более близком расстоянии к линзе. Явление хроматической аберрации возникает при прохождении через линзу пучка света с различной длиной волны. Так как более коротковолновые синие-фиолетовые лучи преломляются сильнее, чем красные, объект приобретает окраску, которая ему не свойственна. По наличию корректирующих аберраций линз в объективах их подразделяют на *ахроматы*, *апохроматы* и *планахроматы*.

Ахроматы содержат в своем составе от 1 до 6 линз. Они устраняют почти полностью дефекты сферической и частично хроматической аберрации. Микроскопы МБР-1 и С-11 обычно снабжены именно ахроматическими объективами. Апохроматические объективы содержат до 12 линз. Максимального эффекта устранения дефектов с применением апохроматического объектива можно достигнуть в сочетании с использованием компенсационного окуляра. Планахроматы представляют собой разновидность апохроматов, имеющих плоское поле зрения. Объективы-планахроматы полностью устраняют искривление поля зрения, обуславливающее неравномерность фокусировки объекта.

*Окуляры.* Окуляр, помещаемый на верхний конец тубуса, состоит из двух линз: верхней (*глазной*) и полевой (*собирающей*). Назначение окуляра — *прямое мнимое* увеличение *действительного обратного* увеличения, которое дает объектив. Рабочее увеличение окуляра может составлять 4х, 7х; 10х, 15х. Окуляры бывают разных типов. С ахроматическими объективами обычно используют *окуляры Гюйгенса*, которые состоят из двух плосковыпуклых линз, обращенных выпуклой стороной к объективу.

При длительной работе с микроскопом полезно пользоваться двойными окулярами - *бинокулярной насадкой*. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

*Увеличение и разрешающая способность микроскопа.* Увеличение объекта обычно рассчитывается как произведение увеличения окуляра на увеличение объектива. Так, если увеличение окуляра равно 15х, а объектива - 90х, то общее увеличение составит 1350 раз. Однако общее увеличение еще не гарантирует четкого изображения увеличенного объекта. Важной характеристикой для микроскопирования является понятие *разрешающей способности*, под которой понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Если увеличивающая способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется объективом и конденсором.

Величина разрешающей способности микроскопа зависит от длины волны используемого света и суммы числовых апертур объектива и конденсора:

$$D = \lambda / A_1 + A_2,$$

где  $D$  - минимальное расстояние между двумя точками;  $\lambda$ , — длина волны используемого света;  $A_1$  - числовая апертура объектива;  $A_2$  - числовая апертура конденсора.

Числовая апертура определяется произведением синуса половины ( $\alpha$ ) острого угла на показатель преломления ( $n$ ) среды, граничащей с линзой:  $A = n \sin \alpha$ .

Максимальная разрешающая способность светового микроскопа составляет 0,2 мкм.

**Осветитель.** Во многих современных микроскопах осветительный аппарат вмонтирован в основание микроскопа. В микроскопе С-11 такого устройства нет, поэтому применяется осветитель, например типа ОИ-31. Патрон с лампочкой может передвигаться в корпусе осветителя при отпуске специального винта. Осветитель вставляется в специальное отверстие в корпусе микроскопа под конденсором, для этого он имеет соответствующий штырек.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11, футляр с набором объективов, кляммами, окуляром. Осветитель ОИ-31.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, постоянные препараты дрожжей и бактерий, хлопчатобумажная тряпочка для протирки объективов.

**Задание 1.** Выбор и закрепление рабочего места. Подготовка микроскопа к работе

1. Осмотрите микроскоп, найдите и проверьте функционирование его механической части.
2. Закрепите объективы в револьвере так, чтобы между 8х и 90х объективами находилось пустое гнездо. Сверху в тубус вставьте окуляр 15х.
3. Проверьте конденсор и ирисовую диафрагму.
4. Закрепите на микроскопе осветитель ОИ-31. Проверьте работу лампы осветителя, подключив его к электросети.

**Задание 2.** Установка света по Кёлеру

1. Снимите окуляр с тубуса микроскопа. Переведите объектив 8х в рабочее положение.
2. Отпустите винт (находится слева), удерживающий патрон с лампочкой в корпусе осветителя.
3. Глядя в трубку тубуса, найдите положение лампы, при котором видно ярко светящуюся спираль.
4. Закрепите винтом это положение лампы в корпусе осветителя.
5. Верните окуляр в тубус.

Задание 3. Микроскопирование постоянных препаратов дрожжей и бактерий, подготовленных лаборантом

1. Поместите препарат на предметный столик. Прижмите клеммами.

2. Поставьте объектив 8х в рабочее положение над препаратом и опустите (глядя на него) его максимально низко к препарату.

3. Глядя в окуляр, медленно поднимайте тубус движением макровинта до обнаружения фокуса препарата. Более четкое изображение найдите движением микровинта.

4. Переведите объектив 40х в рабочее положение над препаратом, корректируйте фокус изображения микровинтом.

5. Зарисуйте препарат при увеличении 15х40, проанализировав несколько полей зрения. Оформление рисунка и масштаб выполните по указанию преподавателя.

6. Переведите револьвер микроскопа на пустое гнездо (заглушку). Нанесите на препарат (в место под объективом) каплю иммерсионного масла. Поместите объектив 90х в рабочее положение (он должен опуститься в масло). Найдите фокус движением микровинта.

7. Зарисуйте препарат при увеличении 15х90, проанализировав несколько полей зрения. Оформление рисунка и масштаб выполните по указанию преподавателя.

8. Поднимите тубус, выньте препарат и поместите его в препаратодержатель. Протрите объектив 90х тряпочкой, смоченной спирт-эфирной смесью.

9. Предъявите рисунки преподавателю на подпись.

Задание 4. Знакомство с методами микроскопии в микробиологии

*Измерение размеров объектов.* Размеры микроорганизмов можно измерить, используя постоянные окрашенные препараты. Для этого микроскоп должен быть снабжен шкалой окулярного микрометра (линейки). Если клетки имеют шаровидную форму (кокки), то измеряют диаметр клеток. У палочковидных форм определяют длину и ширину (диаметр) клетки.

*Окулярная линейка* представляет собой круглую стеклянную пластинку, в середине которой нанесена шкала делений общей длиной 5 мм. Она помещается под линзой окуляра. Расчет истинных размеров клеток требует измерения не менее 10—20 клеток и *объектного микрометра*, который представляет собой металлическую пластинку в форме предметного стекла с отверстием в центре. В отверстие помещается стекло с линейкой. Общая шкала линейки объектного микрометра составляет 1 мм, величина одного деления - 10 мкм. Объектный микрометр используется для определения цены деления окулярной линейки. Его помещают вместо препарата на столик микроскопа и фокусируют изображение линейки при малом увеличении (8х). Затем линейку перемещают в центр поля зрения и переводят на тот объектив, при котором микроскопировался препарат. Передвижением

ем столика микроскопа устанавливают шкалы объектного и окулярного микрометра так, чтобы они были параллельны и перекрывали друг друга. Для определения цены деления используется принцип *нонуса*. Например, в двух делениях объектного микрометра (20 мкм) умещается пять делений окулярного микрометра, тогда одно деление окулярного микрометра при данном увеличении равняется 4 мкм (20 : 5). Полученные значения цены делений окулярной линейки будут справедливы только для данной системы *окуляр-объектив*.

*Микроскопия в темном поле.* Более тонкую структурную организацию объекта можно рассмотреть, используя *эффект Тиндаля* — освещение сбоку на фоне темного поля.

Темное поле создается в светооптическом микроскопе заменой обычного конденсора на темнопольный с применением источника сильного света. При этом апертура конденсора должна на 0,2-0,4 единицы превышать апертуру объектива. Рекомендуется применять конденсор с апертурой 1,2 ед. и объективы с апертурой 0,65-0,85. Также имеет значение толщина предметного и покровного стекол, первое — толщиной 1,2 мм, а второе — 0,17 мм.

Метод микроскопии в темном поле применяется обычно для микроскопирования *живых клеток*. Частично условия затемнения поля зрения можно создать, прикрывая ирисовую диафрагму на обычном микроскопе. Это позволит увидеть некоторые морфологические особенности микроорганизмов. Например, в цитоплазме довольно крупных дрожжевых клеток будут хорошо заметны ядро, включения (зерна гликогена и капельки жира). Более мелкие бактерии затемнением можно сделать более заметными на прижизненных препаратах, так как в ярком свете они практически не видны.

*Фазово-контрастная микроскопия.* Почти все живые клетки прозрачны, поскольку световые лучи, проходящие через них, не меняют своей амплитуды, хотя изменяются по фазе. Метод фазово-контрастной микроскопии основан на преобразовании фазовых изменений, происходящих со световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью определенного оптического устройства. Обычно используется фазово-контрастное устройство КФ-4, которое представляет собой набор фазовых объективов, конденсоров с кольцевыми диафрагмами и вспомогательного микроскопа (оптическое устройство, помещаемое в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста). Метод позволяет изучать живые объекты, контрастность которых и достигается с помощью фазово-контрастного устройства.

*Люминесцентная (флуоресцентная) • микроскопия.* Данный метод микроскопирования основан на способности ряда веществ, входящих в состав живых систем, флуоресцировать при освещении их светом определенной длины волны. Наиболее интенсивное свечение можно получить, используя освещение коротковолновыми лучами: сине-фиолетовыми или

ультрафиолетовыми. При этом клетки обычно светятся желто-зеленым или оранжевым светом. Подобное явление получило название *собственной* или *первичной люминесценции*.

Объекты, лишенные собственной люминесценции, обрабатывают специальными красителями - *флуорохромами* (акридин желтый, акридин оранжевый, аураолин, примулин, тиофлавин, конго красный). В данном случае люминесценция обозначается как *наведенная* или *вторичная люминесценция*. Различные красители могут избирательно концентрироваться в определенных структурах клетки. Например, акридин оранжевый окрашивает в зеленый цвет протоплазму, в ярко-красный - метахроматические зерна (волютин), в светло-зеленый - ядро. Малая токсичность растворов красителей позволяет изучать живые клетки без их значительного повреждения.

Оптическая система люминесцентного микроскопа отличается от обычного светопольного микроскопа источником света (можно использовать *ртутную* лампу) и наличием на пути лучей двух светофильтров: синего светофильтра перед конденсором и желтого — в окуляре микроскопа.

Люминесцентная микроскопия позволяет сочетать цветное изображение с хорошей контрастностью объектов, поэтому создает возможность более эффективного изучения морфологических особенностей клеток и внутриклеточных микроструктур.

*Электронная микроскопия.* В электронной микроскопии освещение объекта обеспечивает не луч света, а поток электронов от вольфрамовой нити, нагреваемой электрическим током. Разрешающая способность электронного микроскопа составляет от 0,2 до 0,4 нм, среднее рабочее увеличение - 100 000 раз.

В биологических исследованиях часто используют *трансмиссионный микроскоп*. Электронный микроскоп состоит из источника электронов - *электронной пушки*; *электромагнитных катушек*, выполняющих роль конденсорной, объективной и проекционной линз; предметного столика; экрана для получения изображения и окуляра. Также для работы электронного микроскопа необходим вакуумный насос (электроны движутся только в вакууме). Электроны в трансмиссивном электронном микроскопе движутся подобно лучам света в светодольной микроскопии. Если экран, представляющий собой металлическую пластинку, покрытую слоем сульфида цинка или смеси сульфида цинка с селенидом кадмия, заменить на фотопластинку, изображение объекта фотографируется. Препараты для электронной микроскопии требуют специальной подготовки, общая толщина препарата и подложки не должна превышать 0,25 мкм. Обычно готовят ультратонкие срезы. Контрастность срезов обеспечивается напылением тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) или обработкой различными контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранил ацетатом).

Объемное, почти трехмерное изображение можно получить с помощью *сканирующего* или *растрового* электронного микроскопа. В данном микроскопе электронный луч подвижный, и он последовательно обегает поверхность исследуемого объекта по квадратному растру, передавая полученную информацию на электронно-лучевую трубку, покрытую люминофором, светящимся под действием электронов. Пределы полезного увеличения у сканирующего электронного микроскопа меньше, чем у трансмиссионного, всего 10–15 тыс. раз; меньше и разрешающая способность. Препараты для сканирующего электронного микроскопа также требуют специальной обработки, основная цель - обезвоживание без сморщивания поверхности объекта. После обезвоживания поверхность препарата покрывают тонким слоем сплава золота и платины, который повышает электропроводность поверхности препарата и увеличивает разрешающую способность микроскопа.

## Занятие № 2

### Правила работы с культурами микроорганизмов. Методы приготовления прижизненных препаратов

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Освоить методы отбора материала из жидких питательных сред. Научиться обрабатывать стекла, готовить различные виды прижизненных препаратов и осуществлять их микроскопирование.

*Общие правила приготовления препаратов микроорганизмов для микроскопирования.* Препараты готовят на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2-1,4 мм. Применение более толстых стекол резко снижает возможность получения четкого изображения, то есть снижает разрешающую способность микроскопа из-за нарушения фокусировки конденсора. Особенно толщина стекла влияет на микроскопирование препаратов в иммерсионной системе.

*Подготовка предметных и покровных стекол.* Перед приготовлением препарата поверхность предметного стекла должна быть обезжирена. Обезжиривание может осуществляться с помощью помещения стекол в спирт-эфирную смесь и высушивания затем на воздухе. Однако постоянное использование спирт-эфирного раствора небезопасно для здоровья, поэтому при работе лучше использовать более безопасный метод: на поверхность стекла наносится тонкая штриховая линия кусочком сухого мыла, потом она протирается сухой хлопчатобумажной тряпочкой. Не следует наносить избыток мыла, так как это может привести к порче препарата.

Покровные стекла используются либо новые, либо они должны быть хорошо вымыты и высушены, перед применением их следует осторожно протереть сухой хлопчатобумажной тряпочкой.

## *Приготовление прижизненных препаратов и изучение морфо-функциональных свойств микроорганизмов*

Прижизненные препараты помогают изучить подвижность микроорганизмов. Для этого используют молодую культуру (12-24 час. культивирования). В отличие от движения неподвижных клеток в одном направлении вместе с током жидкости, подвижные бактерии движутся в различных направлениях, вертятся, переворачиваются. По характеру движения можно ориентироваться в расположении жгутиков: при полярном расположении - движения быстрые, «ввинчивающиеся»; при латеральном или перитрихальном - движения плавные, колебательные.

*Препарат «раздавленная капля».* Препарат применяется для изучения подвижности объектов, изучения морфологии микроскопических грибов, простейших, водорослей. Он также удобен для обнаружения и окраски включений запасных питательных веществ.

При работе с жидкой культурой на подготовленное и помещенное на мостик кристаллизатора предметное стекло наносят каплю жидкой культуральной среды, содержащей микроорганизмы. Капля прикрывается покровным стеклом, избыток жидкости удаляется и препарат тут же микроскопируется. В условиях работы с культурой, растущей на плотной среде, на предметное стекло, находящееся на мостике кристаллизатора, наносится сначала капля стерильной водопроводной воды, затем сюда бактериологической петлей вносится небольшое количество культуры.

*Препарат «висячая капля».* Препарат позволяет, так же как и предыдущий, наблюдать наличие подвижности у микроорганизмов, рассмотреть форму клеток, увидеть внутриклеточные структуры, включения у эукариот (например, дрожжей). Для приготовления данного препарата требуется специальное стекло с выемкой посередине. Также для приготовления данного препарата используется только жидкая культура микроорганизмов. В данном случае капля культуральной жидкости с микроорганизмами помещается на покровное стекло, которое сверху покрывается предметным с выемкой, предварительно по краям обработанной вазелином для получения герметичности. После прикрепления стекла препарат переворачивают и микроскопируют.

*Препарат «отпечаток».* Данные препараты применяют для изучения естественного расположения клеток в бактериальной колонии, а также для исследования формы спор и спороносов у актиномицетов и плесневых грибов. Для приготовления «отпечатков» берутся культуры микроорганизмов, выросшие на плотных средах. При работе с бактериальными колониями из агаризованной среды вырезается блок с газонным ростом и пе-

реносится на предметное стекло поверхностью с микроорганизмами вверх. Затем к поверхности подносят другое покровное стекло и осторожно надавливают, стекло с отпечатком можно сразу микроскопировать, а также можно добавить каплю воды или метиленового синего (1 : 40), покрыть покровным стеклом и микроскопировать.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11, осветитель ОИ-31, кристаллизатор с мостиком, стерильная пипетка, штатив, спиртовка, стеклянная палочка.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Метиленовый синий, 1 : 40, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, х/б тряпочки, кусочек мыла, покровные и предметные стекла, предметное стекло с выемкой, вазелин, полоски фильтровальной бумаги, спички.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Огуречный или капустный рассол (или культура дрожжей с добавлением лакто- и бифидобактерий; культуры бактерий на чашках Петри, кусочек хлеба с плесенью).

**ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.** *Перед выполнением заданий убедите все воспламеняющиеся предметы из зоны работы со спиртовкой. Заколите или завяжите длинные волосы, предохранив их от возгорания. Застегните рукава халата. Четко выполняйте все указания преподавателя. Не бросайте загоревшуюся пробку на стол, поместите ее обратно в пробирку. Если загорелся верх пробки, быстро прижмите это место пальцами или (если возгорание занимает значительную площадь) специальной тряпкой, имеющейся на этот случай в указанном преподавателем месте. Не отвлекайтесь при выполнении работы в стерильной зоне спиртовки! Будьте предельно внимательны и осторожны!*

Задание 1. Техника работы с жидкой культурой. Приготовление и микроскопирование прижизненного препарата «раздавленная капля»

*Внимание!* Все нижеописанные операции выполняются после объяснения и демонстрации их преподавателем.

1. Приготовьте предметное стекло, обезжирив его с помощью штриховой линии, нанесенной кусочком мыла. Поместите готовое стекло на мостик кристаллизатора. Протрите покровное стекло, разместив его на крышке вашей рабочей коробочки со стеклами.

2. Возьмите стерильную пипетку в правую руку и освободите ее от упаковки. Далее все манипуляции осуществляйте в стерильной зоне за пламенем спиртовки.

3. В левую руку возьмите пробирку с жидкой культурой так, чтобы пробирка лежала на ладони между большим и указательным пальцами, наклон пробирки должен быть около 45 град. Большой наклон чреват проливанием культуры и попаданием жидкости на пробку, что приведет к порче культуры; меньший - грозит засорением культуры посторонними микроорганизмами из воздуха.

4. Откройте пробку, используя безымянный палец и мизинец правой руки, обработайте горлышко пробирки тройным пронесением в пламени спиртовки движением от себя.

5. Поместите пипетку в пробирку и отберите немного культуры. Обработайте и пробку, и пробирку тройным пронесением в пламени спиртовки и закройте пробирку.

6. Поместите каплю культуры на предметное стекло, а пипетку - в кристаллизатор.

7. Накройте покровным стеклом и уберите избыток жидкости фильтровальной бумагой.

8. Приготовьте микроскоп, настройте свет по Кёлеру. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15х40. Зарисуйте и обозначьте части рисунка по рекомендациям преподавателя.

Задание 2. Приготовление и микроскопирование прижизненного препарата «висячая капля»

*Внимание!* Все манипуляции выполняются только после объяснения и демонстрации преподавателем.

1. Протрите сухой тряпочкой стекло с выемкой и покровное стекло.

2. Взяв стекло с выемкой в руки (за ребра) нанесите вокруг выемки круговую линию вазелином, используя стеклянную палочку. Стекло временно разместите на кристаллизаторе или на крышке коробочки.

3. Возьмите покровное стекло, расположите его строго горизонтально и нанесите маленькую каплю жидкой культуры пипеткой (можно использовать культуру, оставшуюся в кончике пипетки после выполнения первого задания).

4. Переверните предметное стекло выемкой вниз и прикрепите его к покровному стеклу с каплей так, чтобы образовалась герметически закрытая камера. Быстро переверните стекло, капля должна остаться висячей.

5. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15х40.

6. Зарисуйте препарат, просмотрев несколько полей зрения. Сделайте рисунок в тетрадах по указанию преподавателя.

Задание 3. Приготовление и микроскопирование прижизненного препарата «отпечаток» с бактериальной культуры

*Внимание!* Все манипуляции выполняются только после объяснения и демонстрации преподавателем.

1. Приготовьте и поместите на мостик кристаллизатора обычное предметное стекло.

2. Уберите с рабочего места легко воспламеняющиеся предметы и зажгите спиртовку.

3. Поместите чашку Петри в стерильную зону спиртовки, возьмите в руки предметное стекло.

4. Осторожно приоткрыв крышку, проведите отпечатывание выбранной колонии (или участка газонного роста) на предметное стекло.

5. Нанесите на отпечаток каплю метиленового синего 1:40, прикройте покровным стеклом, уберите избыток жидкости.

6. Промикроскопируйте при увеличении 15x40.

7. Зарисуйте препарат, просмотрев несколько полей зрения и пользуясь рекомендациями преподавателя.

Задание 4. Приготовление и микроскопирование прижизненного препарата «отпечаток» хлебной плесени

1. Приготовьте и поместите на мостик кристаллизатора предметное стекло.

2. К чистому предметному стеклу прижмите кусочек хлеба с плесенью.

3. Получив четкий отпечаток, промикроскопируйте его с увеличением 15x40.

4. Зарисуйте препарат, просмотрев несколько полей зрения.

*Внимание!* При выполнении рисунков придерживайтесь масштаба, указанного вам преподавателем. Делайте надпись и подписи к рисунку, используя образец, данный преподавателем.

5. Уберите свое рабочее место. Сдайте работу преподавателю.

### Занятие Ж» 3

## Правила работы с культурами микроорганизмов. Методы приготовления постоянных препаратов

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Освоение техники работы с культурами, выросшими на плотной среде с помощью бактериологической петли. Обучение методу приготовления и окраски постоянных препаратов.

*Приготовление постоянных препаратов.* Для приготовления постоянных препаратов используются предметные стекла, которые обезжириваются так же, как описано выше. Затем на предметное стекло последовательно наносятся капля воды и небольшое количество культуры бактериальной петлей и тщательно размазываются. Мазок должен быть тонким, тогда (во-первых) он быстро высохнет и (во-вторых) будет объективно отражать форму и характер скоплений микроорганизмов данной культуры. Мазок помещается на мостик кристаллизатора и высушивается. После полного высыхания его необходимо зафиксировать. Фиксирование мазка проводят тройным пронесением через пламя спиртовки. После фиксирования на мазок наносится краситель, который оставляют на определенное (для каждого метода окраски разное) время. По истечении времени краситель смывают, остатки воды убирают фильтровальной бумагой и мазок микрофотографируют при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.

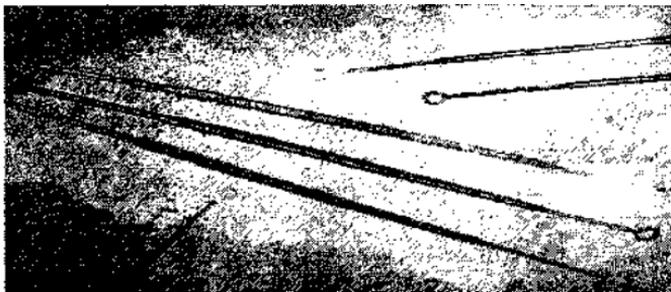


Рис. 2. Различные виды бактериологических петель

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, штатив для пробирок, бактериологическая петля, колба для водопроводной воды, песочные часы на 3 минуты.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина в капельнице, вода, спички, предметные стекла, кусочек мыла, х/б тряпочки, фильтровальная бумага.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры *Bacillus sp.* и *Micrococcus luteus* на скошенном агаре, зубной налет.

**Внимание!** Выполнение всех манипуляций начинать только после объяснения и демонстрации преподавателем с его разрешения.

**Задание 1.** Приготовление постоянных препаратов бацилл и микрококков

1. Приготовьте и поместите на кристаллизатор два предметных стекла и нанесите в центр каждого по маленькой капле воды из капельницы.

2. Уберите с рабочего места легко воспламеняющиеся предметы и зажгите спиртовку.

2. Возьмите пробирку с культурой бацилл (или микрококков) в левую руку так, чтобы она находилась на ладони между большим и указательным пальцами скошенным агаром вверх. Причем пальцы должны помещаться на расстоянии примерно трети пробирки от верха (чтобы не обжечь пальцы), пробирка наклонена под углом 45°.

3. В правую руку возьмите бактериологическую петлю (для левой - наоборот).

4. Прокалите петлю в верхней части пламени спиртовки до красного каления, держа ее строго вертикально.

5. Откройте пробку пробирки, зажав ее безымянным пальцем и мизинцем правой руки, обожгите горлышко пробирки, трижды пронеся ее в пламени спиртовки.

6. Опустив петлю в пробирку, быстро остудите ее о стекло и аккуратно возьмите немного культуры на петлю.

7. Закройте пробирку с культурой, предварительно обработав края пробирки и пробку одновременно тройным пронесением в пламени спиртовки (движение направленно от себя).

8. Сделайте мазок культуры на предметном стекле и оставьте до высыхания.

9. Выполните все манипуляции для другой культуры.

10. После высыхания зафиксируйте препараты, трижды пронеся их в пламени спиртовки.

**Задание 2.** Приготовление постоянного препарата зубного налета

1. Приготовьте еще одно предметное стекло и поместите его на мостик кристаллизатора.

2. Возьмите из коробочки стерильную палочку, освободите ее от обертки и снимите с внутренней поверхности коренного зуба налет.

3. Палочкой нанесите мазок на предметное стекло.

4. Высушите мазок и зафиксируйте его.

Задание 3. Окраска мазков и микроскопирование

1. Нанесите на мазки водный фуксин и оставьте на 3 минуты.
2. Смойте водопроводной водой из колбы.
3. Уберите остатки воды фильтровальной бумагой и микроскопируйте при увеличении 15х90 с иммерсионной системой.
4. Сделайте рисунки и обозначения, учитывая масштаб и рекомендации преподавателя.
5. Уберите свое рабочее место. Не забудьте протереть иммерсионный объектив тряпочкой, смоченной в спирт-эфирной смеси.
6. Сдайте оформленную работу преподавателю.

#### Занятие Лг 4

Изучение морфологических особенностей прокариотических клеток

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Изучение морфологии прокариот с помощью постоянных препаратов.

К морфологическим характеристикам относятся форма и размеры клеток, скопления, которые они образуют в связи с особенностями деления, наличие или отсутствие капсул, включений, эндо- и экзоспорообразования и его тип. Для изучения морфологических особенностей применяют как наблюдения за живыми клетками на прижизненных препаратах, так и различные методы окраски постоянных препаратов. Следует помнить, что морфологические характеристики зависят от возраста культуры, составов сред и условий культивирования.

*Основные формы и характер скоплений клеток бактерий.* Клетки бактерий могут быть шаровидными (кокки), палочковидными, извитыми, разветвленными. Иногда встречаются (особенно среди архебактерий) клетки необычной формы: кольца, треугольники, конвертики.

*Шаровидные клетки (кокки).* Форма кокковидных клеток не всегда строго шаровидная, может быть эллипсоидная, бобовидная, близкая к треугольной. Большое значение имеет тип деления и образуемый в связи с этим характер скоплений. Род *Micrococcus* характеризуется делением в трех плоскостях с разной скоростью, поэтому образует скопления в виде дипло-, тетракокков и неправильной формы. Встречаются и одиночные клетки (рис. 3). Подобный характер деления и тип скоплений встречается и у рода *Staphylococcus* (рис. 3).

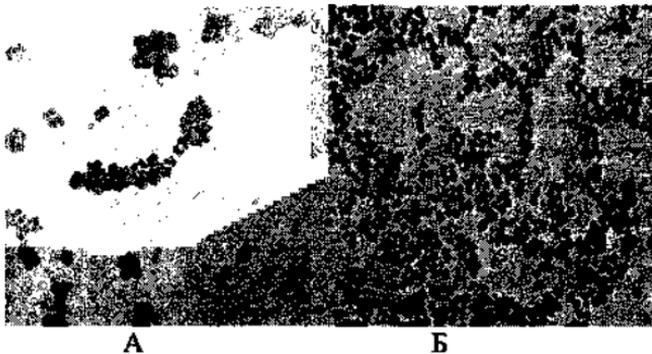


Рис. 3. А - микрококки; Б - стафилококки

Представители рода *Streptococcus* делятся в одной плоскости и не расходятся, при этом формируются цепочки клеток. Сарцины (*Sarcina*) - шаровидные бактерии, которые делятся в трех плоскостях с одинаковой скоростью, поэтому кроме дипло-, тетракокков образуют скопления кубической формы из 8 клеток (рис. 4).

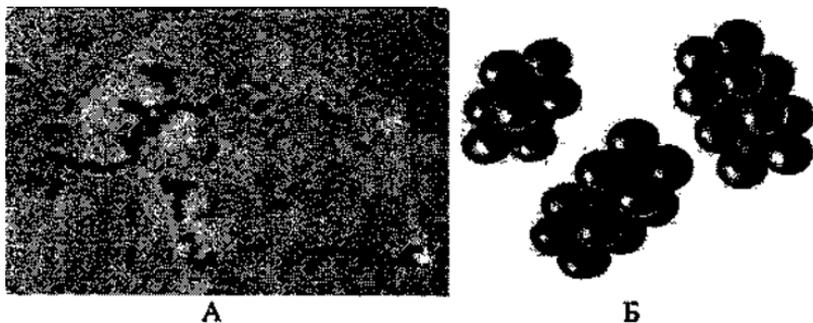


Рис. 4. Стрептококки (А), сарцины (Б)

*Палочковидные бактерии.* Могут быть более короткими (2-5 мкм) или длинными (10-12 мкм). У многих бактерий длина зависит от условий культивирования и возраста культуры. Форма концов клетки является характерным признаком, она может быть округлой, тупой, квадратной, заостренной. Палочковидные бактерии делят на две группы: эндоспорообразующие (бациллы) и неэндоспорообразующие (бактерии). Наиболее распространенными эндоспорообразующими бактериями являются представители родов *Bacillus* и *Clostridium* (рис. 5).

•••и ^ - Ж У , #

А

Б

Г \*

Б \_?>•- at!>\*---»  
В

Г

Рис. 5. Палочковидные бактерии: *Bacillus subtilis* (А);  
*Clostridium perfringens* (Б); род *Xanthomonas* (В); *Escherichia coli* (Г)

Обычными красителями при комнатной температуре споры не окрашиваются, поэтому выглядят неокрашенными фрагментами внутри клеток или окрашенными только по контуру, если они уже освободились от остатков вегетативных клеток. Различают различные типы спорообразования, связанные с положением споры в клетках и диаметром споры по отношению к диаметру клетки (рис. 6).

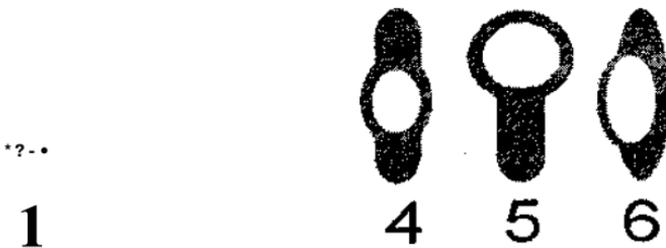


Рис. 6. Типы эндоспорообразования: 1 - бациллярный; 2 - плектридиальный без увеличения диаметра; 3, 5 - плектридиальный с увеличением диаметра; 4 - клостридиальный; 6 - латеральный

Имеет значение и способ обособления дочерних клеток после деления. У фирмикутных бактерий обычно видна поперечная перегородка, а у грациликутных образуется перетяжка, заметная под микроскопом. Известно три основных способа разъединения клеток после деления: простое расхождение; внезапное раскалывание клеток — «snapping» и постепенное сгибание клеток - «bending». Второй и третий способы приводят к появлению V-образных и Y-образных структур.

*Бактерии нитчатой формы.* Данные группы бактерий формируют трихом - слизистый чехол, в который заключаются цилиндрической формы клетки. Трихомы образуют цианобактерии, нитчатые железобактерии, распространенные повсеместно (рис. 7). Это обитатели пресных и морских водоемов, илов. Железобактерии рода *leptothrix* окисляют двухвалентное железо в трехвалентное, гидрат окиси железа откладывается в чехлах, которые имеют желтовато-бурую окраску.



Рис. 7. Многоклеточная нитчатая цианобактерия *Anabaena sphaerica*

*Бактерии извитой формы.* Слегка изогнутые клетки получили название *вибрионы*. Например, холерный вибрион - *Vibrio cholerae*. Бактерии, имеющие несколько завитков, обозначают как *спириллы* (*Spirillum minus*), а много завитков - как *спирохеты* (*Treponema pallidum*). Спирохеты обычно длинные клетки, диаметр которых намного меньше, чем длина (рис. 8).

*Бактерии разветвленной формы.* Разветвленная форма характерна для коринеподобных, нокардиоподобных бактерий и настоящих актиномицетов (рис. 9).

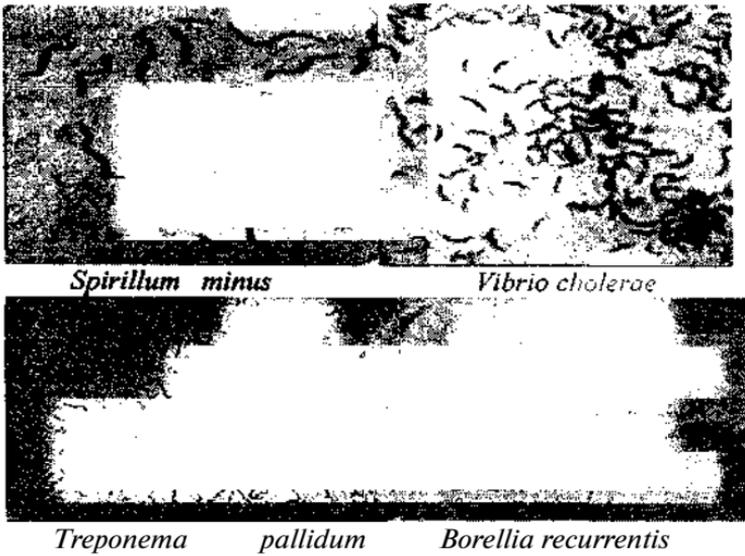


Рис. 8. Извитые формы бактерий

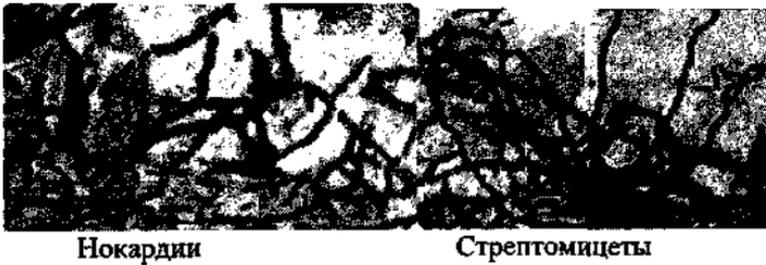


Рис. 9. Разветвленные формы бактерий

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина в капельнице, вода, спички, предметные стекла, кусочек мыла, х/б тряпочки, фильтровальная бумага.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Sarcinaflava* на скошенном агаре, демонстрационные препараты актиномицетов, вибрионов, спирилл.

### **Задание 1. Изучение морфологии палочковидных бактерий**

1. Приготовьте постоянные препараты *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*.
2. Промикроскопируйте, просмотрев несколько полей зрения при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.
3. Зарисуйте, отметив все особенности строения клеток: размеры и форму конца клеток, образование характерных скоплений, наличие или отсутствие спор.

### **Задание 2. Изучение морфологии шаровидных бактерий**

1. Приготовьте постоянные препараты микрококков и сарцин, используя соответствующие колонии, выращенные на чашках Петри.
2. Промикроскопируйте при увеличении 15х90 с иммерсионной системой.
3. Зарисуйте несколько полей зрения, строго соблюдая масштаб, рекомендованный преподавателем.
4. Отметьте на рисунках все характерные особенности кокковидных культур: форму и размеры клеток, наличие или отсутствие поверхностных структур (капсул и чехлов), характерные скопления клеток.

### **Задание 3. Изучение морфологических особенностей разветвленных бактерий на демонстрационных препаратах**

1. Промикроскопируйте при увеличении 15х90 в иммерсионной системе препараты, предоставленные лаборантом.
2. Зарисуйте несколько полей зрения и отметьте особенности разветвленных форм бактерий (коринебактерий, бифидобактерий, нокардий и стрептомицетов).
3. Уберите свое рабочее место и сдайте работу преподавателю.

## *Занятие Же 5*

### **Методы и условия посевов и культивирования микроорганизмов**

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Освоение техники посева и культивирования микроорганизмов. Коллоквиум по пройденному материалу.

*Техника посевов и пересевов культур микроорганизмов.* В микробиологических лабораториях микроорганизмы выращивают на специальных питательных средах (жидких или плотных) в колбах, чашках Петри или пробирках. *Посевом (инокуляцией)* называется внесение тем или иным способом микроорганизмов в питательную среду. *Пересевом (пассерован-*

нием) - перенос тем или иным способом части культуры с одной питательной среды на другую.

*Посев микроорганизмов из воздушной среды.* В воздухе микроорганизмы не живут, а лишь переживают неблагоприятные условия. Попадают в воздух споры грибов и бактерий, вегетативные клетки бактерий из почвы (с пылью), из воды и из других (макро) организмов. Особенно много скапливается микроорганизмов в воздухе закрытых помещений, если там не проводится влажная уборка и проветривание. В зависимости от способа улавливания микроорганизмов из воздуха методы посевов делят на *фильтрационные, аспирационные и седиментационные.*

*Фильтрационные методы* позволяют оценить качественный и количественный состав микробиоты воздуха с использованием специальных фильтров. С помощью воздушнонагнетательного устройства воздух продувается через фильтры, на которых остаются споры и вегетативные клетки микроорганизмов. Затем проводят смыв микроорганизмов с фильтров в специальные питательные среды. Метод мембранных фильтров позволяет изучать состав микробиоты из относительно больших объемов воздуха, концентрируя их на фильтре, использовать данный метод в зимних условиях при изучении атмосферного воздуха.

*Аспирационные методы* предназначены для оценки качественного и количественного содержания микроорганизмов в определенном объеме воздуха. Для этого используется прибор Дьякова, ПОВ-1 (прибор для отбора воздуха), ПАБ-2 (приборотборник аэрозольный бактериологический), бактериоуловители Речменского и Киктенко и другие приборы. Наиболее широко распространен аппарат Кротова. Работа аппарата основана на принципе ударного действия струи воздуха, которая при вращении вентилятора засасывается через щель аппарата и с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды.

*Седиментационные методы.* В основном применяется метод Коха. Он основан на оседании микроорганизмов под действием силы тяжести из воздуха на поверхность открытой питательной среды. Метод не отличается особой точностью, так как поверхность среды обычно мало сопоставима с объемами исследуемого воздуха, микроорганизмы различаются по размерам и весу, а также могут находиться в различных по размерам и весу частицах пыли или аэрозоля.

*Посев (пересев) микроорганизмов в(на) твердую питательную среду.* Посевы (пересевы) в(на) твердую питательную среду проводят *методом штриха по поверхности агара, методом укола вглубь среды, методом распределения по поверхности агара шпателем Дригальского.*

*Метод штриха.* Часть культуры (или среды, где находятся микроорганизмы) берется на бактериологическую петлю и ей наносится легкая штриховая линия по поверхности агара. Таким образом делаются посевы и пересевы культуры на чашки Петри или скошенный агар в пробирке.

*Метод укола вглубь среды.* Проводится с помощью бактериологической петли или иглы определенной длины. Посев (или пересев) осуществляется в пробирки, наполненные плотной питательной средой на 2/3, и предполагает изучение отношения бактерий к кислороду. После взятия части культуры на петлю (иглу) делается укол вглубь среды на величину длины петли (иглы).

*Метод распределения по поверхности агара.* Используется для посевов из жидкостей или жидкой питательной среды на чашки Петри. Определенное количество жидкости наносится в центр чашки Петри стерильной пипеткой и распределяется по поверхности с помощью стерильного шпателя Дригальского.

*Методы культивирования на питательных средах.* В микробиологических лабораториях используют методы выращивания микроорганизмов на питательных средах. Питательные среды классифицируют по составу, консистенции и назначению.

По составу питательные среды делятся на *натуральные, синтетические и полусинтетические.*

*Натуральные среды* состоят из продуктов животного или растительного происхождения. На натуральных средах развиваются многие микроорганизмы, поскольку там содержатся все необходимые для роста и развития микробиоты компоненты. Они отличаются неопределенностью состава и используются для выращивания гетеротрофов, накопления биомассы и диагностических целей. Примерами служат мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА), рыбо-пептонный бульон (РПБ) и агар (РПА), дрожжевой экстракт, неохмеленное пивное сусло, картофельная среда.

*Синтетические среды* состоят из известных химических компонентов в заданном количестве, поэтому могут быть использованы для выращивания определенных групп микроорганизмов, изучения особенностей обмена веществ бактерий. Данные среды позволяют также изучать параметры роста культуры, определив лимитирующий субстрат и изменяя его количество. Например, среда Чапека для культивирования грибов имеет определенный состав (см. Приложение 1).

*Полусинтетические среды.* Содержат натуральный компонент и минеральные соли в определенном количестве. Среда для многих гетеротрофов можно готовить, используя дрожжевой экстракт и добавляя соли - источник фосфора, источник калия, азота, моносахариды. Например, среда для культивирования кишечной палочки (см. Приложение 1).

По назначению среды делят на *элективные, селективные и дифференциально-диагностические.*

*Элективные среды* предназначены для культивирования определенной группы микроорганизмов, отличающейся особенностями метаболических процессов. Например, среда Постгейта для культивирования сульфатредукторов. Впервые элективные среды предложены М. Бейеринком и

прочно введены в практику микробиологических исследований С.Н. Виноградским.

*Селективные среды* обеспечивают преимущественный рост только представителей одного рода. Они обычно имеют сложный состав и содержат ингибиторы (антибиотики или бактерицины), подавляющие рост других представителей.

*Дифференциально-диагностические среды* позволяют провести идентификацию определенных групп микроорганизмов по ряду признаков: культуральных или биохимических. Часто в состав сред вводят различные метаболиты и индикаторы, имеющие различную окраску в зависимости от рН или ряда продуктов, выделяемых в среду бактериями, микроскопическими грибами. Например, дифференциально-диагностические среды Гисса, содержащие индикатор и различные углеводы.

По консистенции питательные среды подразделяют на *жидкие, сыпучие, полуплотные и плотные*.

*Жидкие* среды используют для изучения параметров роста культуры, влияния различных метаболитов и ксенобиотиков на рост и метаболизм микроорганизмов. Культивирование осуществляют в колбах при непрерывном перемешивании.

*Сыпучие* среды применяют в промышленности. Например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором.

Для получения *плотных и полуплотных* сред используют специальные уплотнители: полисахарид агар-агар, белок желатин. Плотные и полуплотные среды применяют для культивирования микроорганизмов на чашках Петри, в пробирках.

Для получения плотной среды добавляют в жидкую питательную среду 1-2 % агар-агара или 10-15 % желатина. Полуплотная среда получается при добавлении 0,2-0,5 % агар-агара или 3-5 % желатина.

Агар-агар - это сложный полисахарид, который плавится при 100 С и застывает при 40°С. При остывании агар выделяет «конденсационную» воду, поэтому чашки Петри ставятся на крышку для предотвращения затекания воды на питательную среду и размывания культуры.

Желатин - белок соединительной ткани, образуемый им гель менее плотный, чем агар. Плавление происходит при температуре 28-30 С. Кроме того, желатин является питательной средой для микроорганизмов, синтезирующих много протеолитических ферментов. Поэтому его используют для изучения способности микроорганизмов к гидролизу белков типа желатина. Инкубацию с желатиновой средой осуществляют при температуре не выше 25°С.

*Условия культивирования микроорганизмов.* Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется *культивированием*, а выросшие микроорганизмы - *культурой*. При росте в жидкой среде микроор-

ганизмы формируют пленки, осадки, суспензии, а на плотных средах - колонии. Инкубацию осуществляют при оптимальной для данной группы микроорганизмов температуре в термостатах, в закрытых емкостях, предотвращающих засорение. Также каждая культура требует определенного времени выращивания, среды с оптимальным соотношением компонентов и рН, влажности, светового режима и режима аэрации.

Значительно отличаются условия культивирования аэробов и анаэробов. облигатные аэробы культивируют на поверхности плотных сред: в чашках Петри и на поверхности скошенного агара в пробирках. При инкубации в жидких средах необходимо заполнение емкости (колбы или пробирки) только на 1/3 объема, чтобы оставалось достаточно воздуха. Емкость закрывается ватно-марлевой пробкой, пропускающей воздух. Кроме того, необходимо постоянное перемешивание среды так, чтобы осевшие под действием силы тяжести клетки были вынесены на поверхность. Инкубирование в больших количествах в ферментерах предполагает обязательное продувание воздуха при непрерывном перемешивании культуры. При культивировании анаэробов используется глубинное выращивание в толще среды, при этом емкость заполняется без остатка воздуха и плотно закрывается пробками, не пропускающими воздух. Перед посевом из сред убирается воздух с помощью кипячения. При посеве в плотные среды пробирки заполняются на 2/3 объема, агар располагается «столбиком», а посев производится уколом вглубь среды. На чашки Петри посев осуществляется под агар (после посева наверх наносится слой агара температурой 38°C). Часто для выращивания строгих анаэробов, не имеющих средств для защиты от молекулярного кислорода, используют анаэроостаты, где воздух откачивается и пространство заполняется азотом или аргоном.

*Условия стерильности.* *Стерилизацией* называется процесс полного уничтожения микроорганизмов. Существуют также понятия о дезинфекции и пастеризации. *Пастеризация* - это процесс частичного уничтожения микроорганизмов (вегетативных клеток, но не спор). *Дезинфекция* — процесс уничтожения патологических микроорганизмов.

Пастеризация обычно осуществляется с помощью нагревания объектов до температуры 85-95°C и используется для тех продуктов, которые изменяют свои органолептические свойства при более высокой температуре. Например, молоко. Кипяченое молоко имеет уже совсем другой вкус по сравнению с сырым молоком. Дезинфекция проводится в помещениях для уничтожения патогенных энтеробактерий, не образующих эндоспор. Энтеробактерии менее устойчивы и могут быть уничтожены такими дезинфицирующими средствами, как этиловый спирт, моющие и хлорсодержащие средства.

Стерилизация - необходимое условие работы с микроорганизмами. Стерилизации подвергаются посуда, инструменты, среды для культивирования. Помещение для работы и рабочее место обычно дезинфицируются:

проветриваются, подвергаются влажной уборке с дезинфицирующими средствами. Полная стерилизация может быть достигнута только в небольшом помещении (бокс) за счет включения бактерицидных ультрафиолетовых ламп на некоторое время (в зависимости от площади помещения). Стерильность, однако, все равно нарушается при входе в помещение бокса лаборанта. Поэтому полного отсутствия микроорганизмов в воздухе добиться очень сложно.

Для стерилизации применяют методы *термической и холодной обработки* сред, инструментов и посуды. Термическая стерилизация может осуществляться путем *прокаливания (фламбирования) в пламени горелки, обработки горячим воздухом, насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробной стерилизации горячим паром (тиндализации)*. Холодная стерилизация предполагает *фильтрование через бактериальные фильтры, обработку ультрафиолетовыми лучами с помощью бактерицидных ламп*.

Фламбированием обрабатывают металлические инструменты: пинцеты, бактериологические петли, шпатели, а также кончики стеклянных пипеток. Стерилизация горячим воздухом проводится в сушильном шкафу с определенной температурой и определенное (зависящее от температуры) время. Таким образом стерилизуют посуду: колбы, чашки Петри, пробирки, пипетки. Для более длительного сохранения стерильности посуду предварительно заворачивают в бумагу, а пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками. Температура в сухо-жаровом шкафу обычно колеблется от 150 до 200°C. Стерилизация при 150°C наступает через 2 часа; при 165°C - 1-1,5 часа; при 180°C - 40 минут; при 200°C - 15-20 минут. Наиболее удобной является стерилизация при 170°C в течение 45-50 минут. Так как дальнейшее нагревание сопровождается обугливанием бумаги.

*Техника безопасности! Перед стерилизацией посуды и инструментов в сухо-жаровом шкафу обязательно получите инструктаж у преподавателя. Не устанавливайте и не меняйте температуру нагревания без разрешения преподавателя. После окончания времени стерилизации отключите шкаф от источника питания и не открывайте шкаф до его охлаждения во избежание растрескивания посуды и ожогов.*

Простерилизованную посуду необходимо хранить в темном сухом месте, обертка снимается перед ее использованием.

Фламбирование проводят в верхней части пламени горелки, которая является самой горячей. Бактериологическая петля обрабатывается в вертикальном положении до красного каления.

С помощью ультрафиолетовых (бактерицидных) ламп проводят стерилизацию помещений (микробиологический бокс, микробиологическая лаборатория, операционная), а также стерилизацию посуды и материалов, не выдерживающих нагревания (пластиковой посуды, бумажных дисков, марли).

*Стерилизация питательных сред.* Стерилизацию питательных сред можно провести горячим паром в аппарате Коха. При однократной обработке в течение 30 минут погибнут все вегетативные клетки, но споры останутся жизнеспособными, то есть полной стерилизации не будет. Поэтому для сред, компоненты которых выдерживают обработку горячим паром, необходима дробная стерилизация, или *тиндализация*. Обработанную однократно среду оставляют до остывания, при этом по достижении температуры 28—30 С в ней прорастают споры. Среда снова подвергается обработке горячим паром. После второй обработки среда оставляется на сутки для прорастания трудно оживляемых спор и вновь помещается в аппарат Коха на 30 минут.

*Техника безопасности! Аппарат Коха после окончания времени обработки и выключения открывается только через 10-15 минут во избежание ожогов.*

Однократная стерилизация сред, а также посуды, перевязочных материалов может осуществляться обработкой насыщенным паром при давлении выше атмосферного - *автоклавированием*. Совместное действие давления и высокой температуры пара обеспечивает одновременную гибель и вегетативных клеток, и спор. Для проведения автоклавирования требуется специальная комната, автоклав и специальная подготовка, обучающая условиям и технике выполнения данного процесса.

Температура, дополнительное давление (указывается значение давления, добавляемого к атмосферному) определяются составом питательных сред, стабильностью их компонентов. Среды, содержащие субстраты, не выдерживающие нагревания до 120 С (молоко, дрожжевой автолизат, дрожжевая вода, желатин), стерилизуются при 0,5 атм. в течение 20-30 минут. МПБ и МПА автоклавировуют при давлении в 1 атм. 20-30 минут, картофельную среду и почвенную вытяжку - при 1,5 атм. 30 минут. Имеет значение рН среды: ниже 6,5 происходит пептонизация желатина и среда уже не застынет. В кислой среде при высокой температуре и давлении возможны процессы гидролиза входящих в состав сред полимеров, если реакция среды щелочная, то при стерилизации в осадок выпадают соли железа, карамелизуются и становятся недоступными для микроорганизмов сахара. Поэтому среды стерилизуют в условиях нейтрального рН, а после, если нужно, подкисляют или подщелачивают.

Для сред, субстраты которых не выдерживают нагревания совсем (например, белковые среды, сыворотки, антибиотики, витамины), а также для культуральной жидкости, которую нужно освободить от микроорганизмов, но сохранить все компоненты, применяют фильтрование через бактериальные фильтры: мембранные фильтры, фильтры Зейтца.

*Мембранные фильтры.* Изготавливают из коллодия, ацетата, целлюлозы. По форме это диски толщиной 0,1 мм с размерами пор от 0,35 до 1,2 мкм.

*Фильтры Зейтца.* Плотные диски из смеси асбеста с целлюлозой. С увеличением содержания целлюлозы пористость диска возрастает.

Кроме этого, используют фильтры из каолина с примесью кварцевого песка - «свечи» Шамберлена (ученик Пастера) и Беркефельда. Маркировки и работа с бактериальными фильтрами описаны в специальных практических руководствах.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Чашки Петри, пробирки, колба с дистиллированной водой, пипетки, шпатели, бумага для заворачивания.

Задание 1. Знакомство с устройствами для стерилизации посуды, инструментов и сред

1. Познакомиться с работой сушильного шкафа, аппарата Коха, бактерицидных ламп.
2. Подготовить для стерилизации чашки Петри, пробирки с дистиллированной водой, пипетки и шпатели.

Задание 2. Коллоквиум по пройденным темам

*Вопросы к коллоквиуму*

1. Основные отличия прокариотической организации клеток от эукариотической.
2. Размеры и форма клеток бактерий. Жизненные формы бактерий<sup>^</sup>
3. Дифференциация клеток и покоящиеся формы бактерий.
4. Поверхностные структуры прокариотических клеток: слизистые слои, капсулы, чехлы, ворсинки.
- »5. Органы движения бактерий: жгутики. Строение и механизмы движения. Расположение жгутиков.
6. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий.
7. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.
8. Необычные клеточные стенки бактерий. Клеточные стенки архебактерий.
9. Особенности строения и функций цитоплазматической мембраны прокариот. Видоизменения ЦПМ.
10. Цитоплазма. Нуклеоид, процессы репликации ДНК у бактерий. Плазмиды.
11. Клеточные органоиды бактерий: рибосомы, включения.
12. Методы изучения морфологии бактериальных клеток.
13. Методы посевов, пересевов и культивирования микроорганизмов.
14. Понятия и методы стерилизации, пастеризации, дезинфекции.

## Занятие № 6

Посевы микроорганизмов из различных сред обитания.  
Бактериологическое исследование воздуха закрытых помещений

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Осуществление посевов проб почвы и воздуха для количественного учета микроорганизмов. Коллоквиум по пройденному материалу.

Основные места обитания микроорганизмов: почва, вода и макроорганизмы. В воздухе микроорганизмы не живут, но, попадая туда из почвы, воды и макроорганизмов, переживают неблагоприятные для жизни условия.

*Почвенная микробиота.* Наибольшее количество микроорганизмов обнаруживается в почве. Масса биоты, включая бактерии, грибы, водоросли, может достигать нескольких тонн на гектар почв. Микроорганизмы - основные почвообразователи. Состав и процессы жизнедеятельности микробиоты в значительной мере зависят от свойств и растительного покрова почвы. Корневые выделения растений - мощный фактор развития микроорганизмов, возможностей взаимодействий между собой и с макроорганизмами и их биохимической активности. На корнях растений развиваются грибы, с клетками корня вступают в симбиоз бактерии; что сопровождается образованием клубеньков. В почвах обнаруживаются микроскопические водоросли, цианобактерий. Из цианобактерий обычны виды рода *Microcystis* — бесформенные или близкие к округлым слизистые колонии с мельчайшими шаровидными клетками, расположенными<sup>1</sup> беспорядочно в толще слизи. Клетки рода *Gloeocapsa* - более крупные, объединены по две или четыре в многослойные слизистые капсулы. Колонии некоторых видов этого рода образуют окрашенные колонии: желтые, красные, фиолетовые. Часто встречаются представители родов *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria* и другие. Интенсивное развитие почвенных водорослей и цианобактерий возможно только в *фототрофном слое - верхнем слое почвы*. В зависимости от влажности почвы и наличия листового опада этот слой составляет несколько сантиметров. Из простейших в почве обитают жгутиковые (*Euglena*, *Chlamydomonas*, *Cryptomonas*, *Ochromonas*); саркодовые: голые и раковинные амёбы; инфузории - *Colpoda*, *Paramecium*.

В почве встречается огромное количество различных представителей царства грибов, поскольку они активные разлагатели органического вещества. Из класса зигомицетов в почве живут представители родов *Rhizopus*, *Mucor*, *Zygorhynchus*, *Phycomyces*, *Mortierella*. Аскомицеты и базидиомицеты представлены очень обширно. Микроскопические аскомицеты дрожжи в природе в основном находятся в ассоциации с растениями. Они обильно развиваются на листовых пластинках; в нектаре цветков, в экссудатах деревьев, в раневых повреждениях, на поверхности ягод, плодов и фруктов.

В почве дрожжей относительно немного, наиболее хорошо изучены педобионты (обитатели почв) из рода *Lipomyces*. Липомидеты участвуют в трансформации органических соединений, их внеклеточные полисахариды оказывают воздействие на структурные свойства почвы и, возможно, включаются в состав гумуса. Из несовершенных микроскопических грибов особенно много в почве гифомицетовых. Некоторые из них разлагают целлюлозу и другие полимеры мертвых растительных тканей. Самые распространенные грибы среди почвенных гифомицетов - *Penicillium* и *Aspergillus*. К гифомицетам относятся также темноокрашенные грибы родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Stemphylium* (рис. 10). Эти грибы синтезируют внутриклеточные черные пигменты - меланины, которые после отмирания мицелия входят в состав гумуса. Многие несовершенные грибы - обитатели почв - поражают корневые системы растений (фузариоз, корневые гнили). Инфекционные зачатки некоторых фитопатогенных грибов могут длительное время сохраняться в почве без развития за счет действия микроорганизмов-антагонистов, выделяющих супрессорные соединения. К таким микроорганизмам относятся бактерии из группы *актиномицетов*.

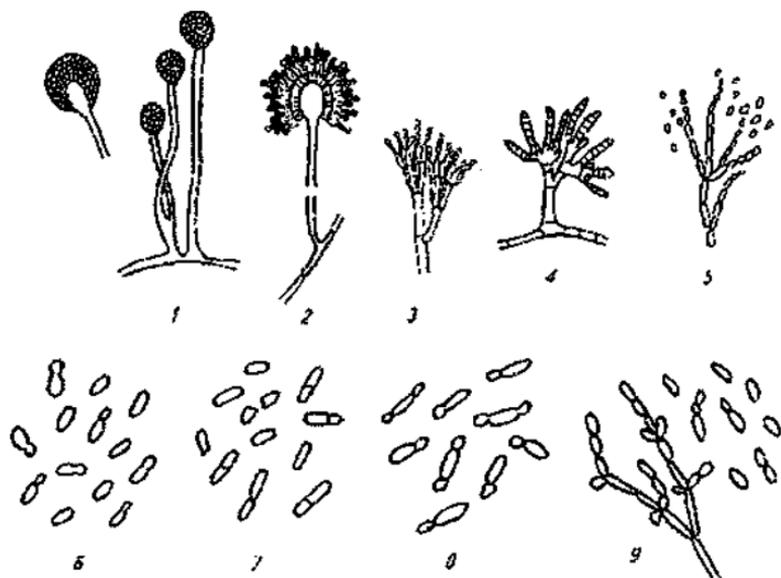


Рис. 10. Представители несовершенных грибов (схематическое изображение):  
 1 - р. *Mucor*; 2 - р. *Aspergillus*; 3 - р. *Penicillium*;  
 4 - р. *Fusarium*; 5 - р. *Oidium*; 6 - р. *Saccharomyces*;  
 7 - р. *Schizosaccharomyces*; 8 - *Saccharomycoides*; 9 - р. *Candida*

Миксомицеты - небольшая и своеобразная группа грибоподобных организмов. Они имеют амебоидную стадию, вегетативное тело, представленное голый плазменной массой. Спороносные структуры - спорокарпы — сходны со спороносными образованиями у грибов. В клеточных стенках спор и спорокарпов, в отличие от грибов, присутствует целлюлоза. У многих в циклах развития есть подвижные стадии - миксофлагелляты с двумя гладкими апикальными жгутиками. Плазмодий содержит множество ядер и обладает отрицательным фототаксисом и положительным гидротаксисом. Питаются миксомицеты так же, как амебы, - бактериями. На сухих освещенных местах образуют слизистую массу желтого, белого, оранжевого или красного цвета. Размножаются спорами, которые в большом числе образуются внутри спорангиев.

В почве обитает множество прокариот. Это основное место обитания свободно живущих бактерий. В почве живут многие представители класса *Proteobacteria* - нового класса бактерий, который образован на основе филогенетического подхода. Это грамотрицательные аэробные палочки и кокки родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Rhizobium* и другие.

К псевдомонадам близки спириллы, сапротрофы, встречающиеся в местах скопления остатков животного и растительного происхождения. На корнях некоторых трав, главным образом злаковых, обитают спириллы с высокой азотфиксирующей активностью - *Azospirillum*. Миксобактерии - скользящие бактерии, они имеют цикл развития с образованием плодовых тел и миксоцист и являются активными разлагателями целлюлозы, это аэробные органотрофы с выраженной гидролитической активностью. Наиболее типичные роды - *Mucococcus*, *Polyangium*. Наиболее активные разлагатели целлюлозы в аэробных условиях - цитофаги. Они способны гидролизовать и другие полисахариды

Из факультативно-анаэробных грамотрицательных палочковидных бактерий типичными представителями почв и воды являются *p. Serratia*, *p. Proteus*. В почвенных суспензиях обнаруживаются простекобактерии - бактерии, обладающие характерным выростом - простекой в виде стебелька. Типичные представители - бактерии рода *Caulobacter*.

В почве обнаруживается множество грамположительных бактерий, которые являются обычными ее обитателями. Здесь можно встретить около 300 видов спорообразующих аэробных палочек рода *Bacillus*. В почве бациллы связаны с разложением различных органических соединений - белков, полисахаридов (рис. 11, 12).

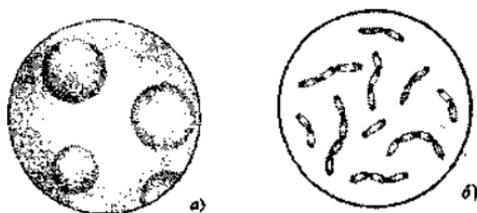


Рис. 11. Колонии на плотной среде (а) и общий вид клеток с эндоспорами *Bacillus megaterium* (б)



Рис. 12. Колонии на плотной среде (а) и общий вид клеток с эндоспорами *Bacillus mycoides* (б)

На глубине 10-15 см обитают анаэробные спорообразующие палочковидные бактерии, представители обширного рода *Clostridium*, насчитывающего в настоящее время более 600 видов, а также роды *Desulfotomaculum*, *Anaerobacter*. Бактерии этой группы способны активно фиксировать молекулярный азот. Клостридии в анаэробных условиях разлагают белки, вызывая процессы гниения. С частичками почвы ряд клостридии может попасть в человеческий организм и вызвать заболевания. При попадании почвы в открытую рану в ней возможно развитие бактерий вида *Clostridium tetani*, выделяющих столбнячный токсин, или бактерий вида *Cl.perfringens*, вызывающих газовую гангрену. В консервы с пылью или водой могут попасть споры *Cl.botulinum*, развитие которых в анаэробных условиях в нейтральной среде будет сопровождаться выделением ботулинического токсина, вызывающего смертельное отравление. Среди анаэробных спорообразующих бактерий обнаружены в почве два вида грамм-отрицательных бактерий, отнесенных к новому роду *Sporomusa*. Пока это единственное исключение из правила, что эндоспоры образуют только грамположительные бактерии. В почвах и содовых озерах встречаются фототрофные гелиобактерии, активные азотфиксаторы.

Из коринеподобных бактерий в почве наиболее распространены артробактерии (род *Arthrobacter*). Это плеоморфная культура: на свежих питательных средах кокки удлиняются, превращаясь в палочки неправильной формы, которые при делении резко изгибаются под углом (bending тип де-

ления). Артробактерии участвуют в процессах минерализации органических соединений в аэробных условиях. Широко распространены в почках целлюлозолитические бактерии рода *Cellulomonas*.

Одной из самых обширных групп почвенной микробиоты являются *актиномицеты* (рис. 13). Нокардиоформные актиномицеты представлены родами *Nocardia* и *Rhodococciis*, способными деструктировать гуминовые кислоты и углеводороды. Род *Frankia* - азотфиксирующие симбионты небобовых растений, они образуют на корнях клубеньки, подобные ризобиям; имеют типичный воздушный мицелий со спорангиями, разделенными на множество спор. Актинопланы - группа актиномицетов, распространенных в почве, лесной подстилке, на живых растениях и в воде природных источников.



Корд-фактор *M. tuberculosis*: палочки, расположенны в виде "косы", жгутов



Рис. 13. Актиномицеты: стрептомицеты и микобактерии

Род *Actinoplanes* образуют не распадающиеся на фрагменты нити, спорангии с подвижными спорами, род *Micromonospora* имеет неподвижные споры, род *Catellatospora* - в цепочках.

Стрептомицеты - актиномицеты, образующие нити, не распадающиеся на фрагменты, воздушный и субстратный мицелий. Род *Streptomyces* формирует обильный воздушный мицелий с цепочками спор разной длины, для представителей других родов (*Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthyd*) характерно слабое развитие воздушного мицелия, разнообразные по форме споры. Стрептомицеты - типичные почвенные обитатели, образующие антибиотики против других бактерий и грибов и проявляющие разнообразную гидролитическую активность, в том числе хитинолитическую.

С фекалиями в почву попадают и представители энтеробактерий, живущие в желудочно-кишечном тракте животных и человека. Большинство из них быстро погибает, так как не может выдерживать жесткую конкуренцию с почвенными обитателями, но некоторые сохраняют жизнеспособность достаточно долгое время.

*Эпифитная микробиота.* На поверхности растений можно обнаружить бактерии, принадлежащие к родам *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Clostridium*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rhizomonas*, *Xanthomonas*, множество различных видов грибов. Среди бактерий на листьях и сладких выделениях растений живут представители родов *Sarcina*, *Micrococcus*, *Mytilococcus*, *Rhodococcus*. Патогенны для растений виды рода *Erwinia*, *Agrobacterim*, многие грибы. До 80 % от общего количества эпифитов составляют клетки *Erwinia herbicola*-грамотрицательной неспорообразующей палочки. На МПА *Erwinia herbicola* формирует золотисто-желтые колонии. Бацилл и актиномицетов на растениях мало, чаще встречаются споры разных видов грибов: *Penicillum*, *Fusarium*, *Mucor* и др.

*Водная микробиота.* Со сточными водами в водоемы попадают представители почвенной микробиоты. Кроме того, есть множество собственной водной микробиоты. В грязных водоемах живет большое количество спирилл, вибрионов и спирохет, а также обитают актинопланеты. В пресных и морских водоемах встречается огромное многообразие цианобактерий, прохлорофитов и различных микроскопических водорослей. В пресных и соленых водоемах также обитают зеленые и пурпурные бактерии, в пластовых водах и стоячих водоемах - сульфатредуцирующие бактерии. В водоемы также попадают и представители живущих в других организмах микробов (симбионтов и паразитов).

*Воздух.* В воздухе микроорганизмы не живут, но, попадая туда из почвы, воды и других организмов, переживают неблагоприятные условия. В атмосферном воздухе на открытых пространствах обнаруживаются споры бактерий, грибов, представители эпифитной микробиоты. В воздухе закрытых помещений к данным микроорганизмам присоединяются представители микробиоты человека, выделяемые им с выдыхаемым воздухом и каплями слюны из ротовой полости и верхних дыхательных путей. Из воздуха закрытых помещений могут высеваться микрококки, стрепто- и стафилококки, сардины, нейсерии, бациллы, неспорообразующие палочки (псевдомонады, лактобактерии, коринебактерии и др.). Реже (при отсутствии проветриваний и влажной уборки) высеваются плесневые грибы, дрожжи, кандиды и другие представители патогенной микробиоты. Количество бактерий и грибов в воздухе определяется площадью помещения, высотой потолков, количеством находящихся в нем людей и частотой уборок.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Стерильные чашки Петри, стерильный МПА в пробирках по 20 мл. Стерильные пипетки и шпатели.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Почвенная суспензия с разведением  $10^4$ , воздух закрытого помещения.

### Задание 1. Посев почвенной микробиоты

1. Осуществить посев почвенной суспензии из разведения  $10^{11}$  (готовится лаборантом).
2. Для этого отобрать 1 мл суспензии из пробирки и перенести в стерильную чашку Петри (без среды), распределить с помощью стерильного шпателя.
3. В чашку залить 20 мл МПА температурой  $45^{\circ}\text{C}$  из пробирки. Температуру среды определить, поднеся пробирку к щеке, если негорячо - среду можно вылить в чашку. Осторожными круговыми движениями, не задевая крышку и не поднимая чашку, агар перемешать с суспензией.
4. После застывания среды чашку перевернуть крышкой вниз, завернуть, промаркировать.
5. Чашки поместить на выращивание в термостат при  $28^{\circ}\text{C}$ .

### Задание 2. Посев воздушной микробиоты закрытых помещений

1. Осуществить посев микроорганизмов из воздуха закрытого помещения седиментационным методом Коха.
2. В стерильную чашку вылить 20 мл МПА. Чашку Петри с застывшим МПА открыть на 10 минут на расстоянии около 1,5 м от пола и дать возможность клеткам и спорам осесть на поверхность агара.
3. Крышку закрыть. Чашку перевернуть крышкой вниз, завернуть в бумагу, промаркировать и поставить на выращивание в термостат при  $28^{\circ}\text{C}$ .

### Задание 3. Коллоквиум по пройденным темам

#### *Вопросы к коллоквиуму*

1. Экологические группы микроорганизмов. Взаимоотношения микроорганизмов между собой и с макроорганизмами.
2. Почвенная микробиота.
3. Микробиота воды и воздуха.
4. Нормальная микробиота кожи и верхних дыхательных путей человека.
5. Нормальная микробиота желудка и тонкого кишечника человека.
6. Нормальная микробиота толстого кишечника человека.
7. Функции микробиоты человека. Дисбактериоз.
8. Санитарно-показательные микроорганизмы.
9. Бактериологический контроль.

## Занятие Же 7

### Количественный учет бактерий и микроскопических грибов в почве и воздухе

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Провести количественный учет бактерий и грибов по КОЕ на МПА. Описать культуральные признаки выросших колоний. Познакомиться с возможностями и недостатками идентификации бактерий и грибов по культуральным признакам. Осуществить посев накопительных культур.

Клетки микроорганизмов на питательной среде начинают размножаться и образуют колонии, видимые невооруженным глазом. Каждая колония обычно вырастает из одной попавшей в данное место клетки или споры или кусочка мицелия, получивших название колониеобразующей единицы (КОЕ) в случае бактерий или пропагулы для грибов.

#### *Количественный учет бактерий в почве*

Количество КОЕ и пропагул в почве устанавливают, умножая число колоний в чашке на степень разведения суспензии. Суспензия готовится из 1 г сырой почвы в стерильную колбу с 99 мл стерильной дистиллированной воды (разведение  $10^{10}$ ). Количество микроорганизмов в данном разведении может оказаться слишком большим, поэтому готовят второе разведение: 1 мл из разведения  $10^{10}$  переносят в стерильных условиях в стерильную колбу с 99 мл стерильной дистиллированной воды. Полученное разведение  $10^{11}$  высевается на МПА.

Однако расчет ведут на 1 г *абсолютно сухой почвы*. Для получения абсолютно сухой почвы в отдельный металлический или стеклянный бюкс помещают навеску почвы (5-10 г) и сушат при 105 С до постоянной массы. Определяют процент влажности почвы. Отсюда находят истинный вес почвы без воды в 1 г сухой почвы (г).

Расчет: X клеток на 1 г сырой почвы = А \* 10 ;

Y клеток на 1 г абсолютно сухой почвы = X \* 1/г.

Пример: На МПА выросло 6 колоний из 1 г сырой почвы разведения  $10^{11}$ . А процент влажности почвы - 30 %, то есть сухой почвы 0,7 г.

Количество клеток на 1 г сухой почвы =  $6 \times 10^{11} / 0,7 = 85714$  клеток.

#### *Количественный учет бактерий в воздухе*

Для расчета микробного числа в воздухе используют формулу Омелянского:

$$X_{\text{кл/м}^3} = A \times 100 \times \text{ЮО} \times 5 / C \times 10,$$

где А — количество выросших колоний; 100 — площадь 100 см ; 100 - коэффициент пересчета на 1 м<sup>3</sup>; С - площадь чашки Петри в см ; 5 - время общепринятой экспозиции, мин; 10 - время выбранной экспозиции, мин.

$$C = TCR^2 = 3,14 \times (4,5)^2 = 63,56 \text{ см}^2$$

Задание 1. Количественный учет микроорганизмов в почве и воздухе закрытого помещения

1. Посчитать количество бактериальных колоний и грибных пропагул в чашке Петри с почвенным посевом.

2. Посчитать общее микробное число на 1 г сухой почвы. Посчитать отдельно бактериальное и грибное число.

3. Посчитать количество бактериальных колоний и грибных пропагул в 1 м воздуха закрытого помещения. Определить качество воздуха, если общее микробное число  $<4000$  кл/м<sup>3</sup> характеризует чистый воздух; от 4000 до 7000 кл/м<sup>3</sup> - загрязненный;  $>7000$  кл/м<sup>3</sup> - грязный.

4. Объяснить полученный результат.

### *Описание культуральных признаков*

Из культуральных признаков выросших на плотных средах колоний важнейшими являются: *форма и размеры колоний; профиль и поверхность колонии; форма края колонии; цвет колонии; структура; консистенция.*

1. Размер колонии. Измеряют с помощью линейки или окулярного микрометра (при очень малом размере). Величина указывается в миллиметрах. Крупными считаются колонии размером более 4 мм, 2-4 мм - средние, 1-2 мм - мелкие. Колонии менее 1 мм называются точечными.

2. Поверхность колонии может быть гладкой, шероховатой, бороздчатой, складчатой, морщинистой, с концентрическими кругами, радиальной исчерченностью и т. д.

3. Профиль колонии - изогнутый, бугристый, плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д. (рис. 14).

4. Блеск и прозрачность - блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная.

5. Край колонии - ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый, лопастный, реснитчатый, ворсистый, ветвистый, фестончатый (рис. 15).

6. Цвет колонии: бесцветная (грязно-белая), белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная, голубовато-серая.

7. Структура колонии: однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая, мучнистая, пленчатая, растущая в агар, легко снимающаяся с агара.

8. Консистенция. Определяется при приготовлении препарата (взятии культуры на петлю). Может быть плотной, мягкой, слизистой (прилипает к петле), тягучей, волокнистой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается).

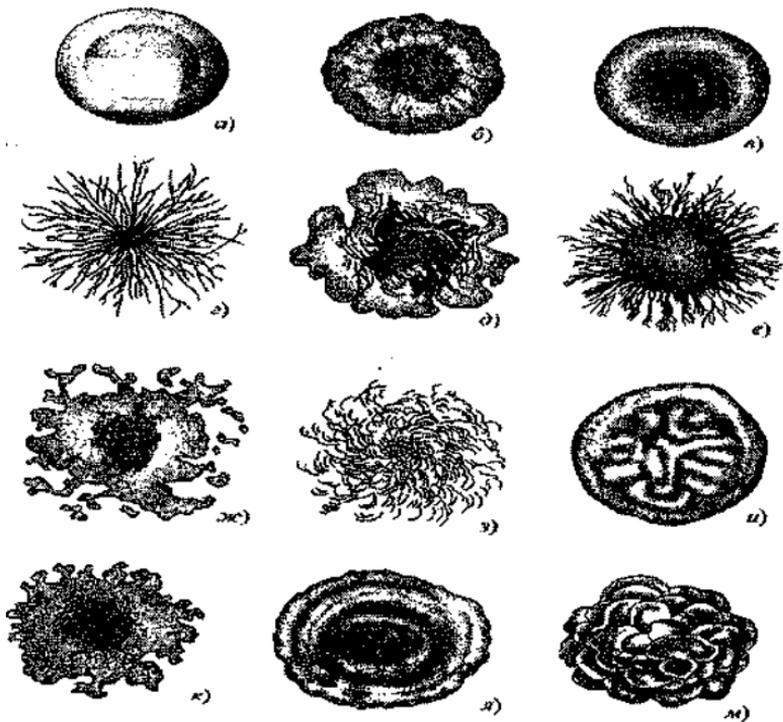


Рис. 14. Форма колоний: а) круглая; б) круглая с фестончатым краем; в) круглая с валиком по краю; г); д) ризоидные; е) круглая с ризоидным краем; ж) амебовидная; з) нитевидная; и) складчатая; к) неправильная; л) концентрическая; м) сложная

## Задание 2. Описание культуральных признаков колоний

1. Выберите одну колонию бактерий на чашке Петри с почвенным посевом и одну из чашки с посевом из воздуха. Опишите их по культуральным признакам.

2. Сравните выбранные колонии с данными ниже описаниями.

3. Приготовьте постоянные препараты из этих колоний.

4. Промикроскопируйте препараты при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.

5. Прочтите описания, приведенные ниже, сделайте возможное предположение о роде, а иногда и виде бактерий, если есть полное совпадение признаков.

Предположение не может быть *утверждением* до выделения бактерий в чистую культуру и идентификации по ряду более важных признаков, чем культуральные и морфологические (окраска по Граму, отношение к кислороду, особенности метаболизма).

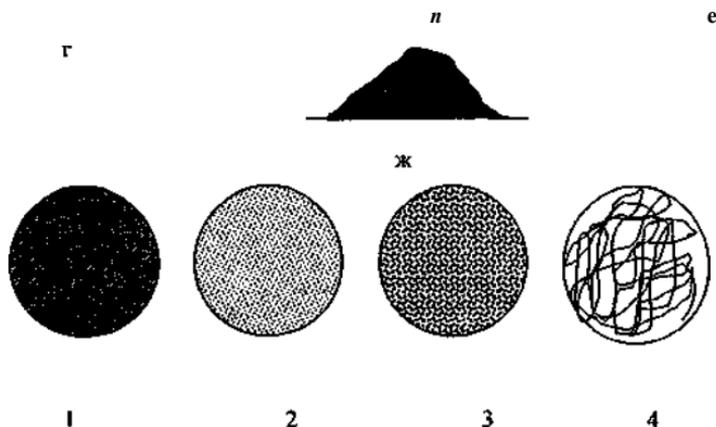


Рис. 15. Профиль и структура колоний

*Род Bacillus*. Аэробы, растут на поверхности агар. Палочковидные, по Граму окрашиваются положительно, образуют эндоспоры.

*Bacillus megaterium* - земляная палочка, образует на МПА колонии гладкие, белые, выпуклые с жирным блеском. Края колонии чаще ровные, реже волнисто-бахромчатые. Споры внутри клеток овальные или цилиндрические, не больше диаметра клеток. Длина клеток 5-7 мкм, иногда больше.

*Bacillus subtilis* - сенная палочка. Колонии на агаре сухие, мелко-морщинистые, бархатистые; бесцветные или розовые, часто срастаются с агаром. Края колонии волнистые. Палочки короткие и тонкие, длина 3-5 мкм. Споры овальные, расположены не строго по центру. Подвижны, жгутики расположены перитрихально.

*Bacillus mesentericus* - картофельная палочка. Вызывает порчу хлеба: мякиш на разломе становится тягучим и липким, появляется затхлый гнилостный запах. Колонии образует тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые. Палочковидные клетки тонкие, длинные или короткие от 3 до

10 мкм. Иногда клетки соединены в длинные цепочки. Споры овальные и продолговатые, не больше диаметра клетки.

*Bacillus mycoides* — грибовидная палочка. Образует ризоидные колонии, напоминающие рост гриба, стелющиеся по поверхности агара. Длина клеток 5-7 мкм, иногда до 10 мкм. В цитоплазме обнаруживается много запасных включений. Подвижные, перитрихи.

*Bacillus cereus* - образует восковидные колонии, толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными краями. Иногда мелкобугристые с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые, диаметром 1-1,5 мкм, длиной 3-5 мкм. Одиночные или соединены в цепочки. Споры овальные, расположены субтерминально (ближе к концу клеток).

*Bacillus Idosus* — колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые. Легко и целиком снимаются с агара. Клетки представляют собой тонкие прямые палочки длиной 2-3 мкм, подвижные. Споры овальные, образуются в центре клетки.

*Под Pseudomonas.* Образуют на МПА колонии круглые, неправильной формы, плоские или выпуклые, слизистые и пастообразные. Могут быть бесцветные, прозрачные или пигментированные (белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные). Характерная особенность - образование некоторыми видами сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента, иногда диффундирующего в агар. Образование пигмента зависит от состава и рН среды. Клетки псевдомонад прямые или слегка изогнутые, часто с заостренными концами. Располагаются одиночно или короткими цепочками. Размеры клеток от 1,5 до 4 мкм в длину и диаметром 0,5-1 мкм. Микроаэрофилы, могут осуществлять нитратное дыхание (денитрофикацию) в условиях недостатка кислорода. Клетки окрашиваются по Граму отрицательно.

*Под Flavobacterium.* Колонии на МПА выпуклые, круглые, диаметром 2-3 мм, край ровный. Чаше колонии гладкие и блестящие, прозрачные, желтого цвета за счет выделения каротиноидов. Пигменты в среду не диффундируют. Встречаются желто-оранжевые и даже красноватые колонии.

Клетки палочковидные, размером от 1 до 3 мкм, тонкие - диаметр 0,5 мкм. Концы клеток закругленные, клетки неподвижны. Располагаются в препарате одиночно, парами и в виде коротких цепочек, реже - в виде нитей. Характерен *спэинг-тип* обособления при делении, напоминающий зацепки. Окрашиваются по Граму отрицательно, эндоспор не образуют.

*Под Micrococcus* на МПА образуют колонии мелких и средних размеров (2-4 мм). Колонии выглядят очень разнообразно: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелкоскладча-

тые; пастообразной или слизистой консистенции, реже - сухие и плотные. Цвет также различный: белый, серый, буроватый, желтый, розовый или красный. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки шаровидные, мелкие (диаметр 0,2-1,5 мкм), одиночные, в парах, тетрадах или образуют скопления неправильной формы. Грамположительные. Аэробы, реже факультативные аэробы.

**Под *Sarcina*.** Образуют колонии средних размеров. Круглые, выпуклые или плоские; гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие. Цвет колоний: желтый, лимонно-желтый, иногда розовый, красный или белый. Клетки кокковидной формы, диаметр 1,8-3 мкм, находятся в парах, тетрадах или 8-клеточных пакетах. По Граму окрашиваются положительно. Аэротолерантные анаэробы.

**Под *Mycobacterium*.** На МПА растут медленно, поэтому образуют мелкие круглые компактные колонии, иногда слегка приподнятые; мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающиеся по субстрату), реже - сухие, крошащиеся, бугристо-складчатые; матовые или блестящие; бесцветные или окрашенные в розовый, оранжевый, желтый, зеленый, синий, бурый или черный цвета. Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки ветвятся, угловатые с неправильными контурами, длиной 3—7 мкм, диаметром 0,7 мкм. С возрастом клетки распадаются на отдельные кокки и палочки. Обособление при делении по снэпинг-типу. Большинство видов грамположительные.

**Актиномицеты** образуют колонии при выращивании не менее 7 суток и позже. Обычно колонии шероховатые, рыхлые по консистенции. Могут быть бугристые, складчатые, бородавчатые с мучнистым налетом. Разноцветные. Срастаются с агаром. При микроскопировании выглядят в виде несептированных ветвящихся нитей длиной 10-50 мкм.

### **Задание 3. Посев в накопительную культуру**

1. Сделайте посев методом штриха на скошенный агар части культуры из выбранной колонии, выросшей на чашке Петри с почвенной суспензией на поверхности агара (аэроб) или уколом вглубь среды на столбик, если выбранная колония образовалась в глубине агара (анаэроб).

2. Прodelайте те же операции по отношению к выбранной колонии из чашки Петри, выросшей при высеве из воздуха закрытого помещения.

**Примечание.** В случае недостатка времени и материалов возможен посев одной накопительной культуры (на выбор) одному студенту.

## Часть II. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

### Тема 2. Получение чистых культур. Цитохимические методы изучения микроорганизмов

При изучении физиолого-биохимических особенностей бактерий и для установления их видовой принадлежности необходимы выделение чистой культуры и работа с ней. *Чистой* называют культуру, выращенную из одной клетки и содержащую микроорганизмы одного вида.

Выделение чистой культуры идет в три этапа: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и анализ ее чистоты.

Для получения накопительной культуры осуществляют посев колонии на среду, где данная культура будет хорошо развиваться, а также создаются другие условия, способствующие ее росту. В идеале сначала подбираются элективные (избирательные) условия среды, обеспечивающие преимущественное развитие данного вида бактерий, затем осуществляется посев и выращивание. Чистую культуру получают из отдельной колонии накопительной культуры или с роста по штриху на плотной среде при условии его однородности. В этом случае готовят разведения по методу Коха и делают посев из самого крайнего разведения, где должно присутствовать небольшое количество бактериальных клеток.

*Получение чистых культур аэробных бактерий.* Посев осуществляется на поверхность агаризованной среды в чашках Петри распределением капли соответствующего разведения стерильным шпателем. Затем этим же шпателем проводится по поверхности агара еще 1–3 чашек. Чашки помещают в термостат на 2–7 суток, как так скорость роста разных микроорганизмов различна. Посев считается удачным, если в чашках присутствуют отдельные, но единообразные колонии, находящиеся на некотором расстоянии друг от друга. Материал колонии микроскопируется и при отсутствии засора другими микроорганизмами отсеивается в пробирку на скошенный агар методом штриха или в жидкую среду методом смыва с петли.

*Получение чистой культуры факультативных аэробов (или анаэробов).* Посев осуществляют из разведения под агар. Сначала в стерильную чашку Петри помещается капля разведения, распределяется шпателем и затем заливается расплавленной средой с температурой 38–40 С.

*Строгие анаэробы* высеваются в полностью наполненные средой флаконы, из которых откачивается воздух. Флаконы плотно упаковываются и помещаются в анаэроостат, где воздух заменен на аргон.

## Занятие № 8

### Анализ накопительной культуры бактерий. Посев и выращивание клона методом Коха

*Описание роста по штриху.* При описании роста по штриху можно использовать следующую схему.

*Мощность и форма роста.* Рост может быть *скудным, умеренным* или *обильным*. Скудный или *слабый* рост дает еле заметную полоску роста не на всей линии штриха. Умеренный или *ограниченный* рост — 1–2 мм шириной по всей штриховой линии. Обильный или *затягивающий* рост не ограничен штриховой линией, распространяется по всей поверхности агара. Некоторые бактерии дают комбинированный рост: в некоторых местах ограниченный, в других - обильный и даже скудный. Такая форма роста связана с большой потребностью данного микроорганизма во влаге (конденсат присутствует снизу скошенного агара).

*Форма края.* Может быть *ровной, гладкой, волнистой, четковидной в виде цепочки изолированных колоний, диффузной, лопастной, ризоидной* и т. п.

*Профиль роста (макрорельеф).* Может быть *плоским* (пленчатый штрих) или *выпуклым* с различной степенью выпуклости.

*Поверхность штриха (микрорельеф).* Может быть *гладкой* или *бугристой, складчатой, бугровато-складчатой*.

*Блеск штриха.* Блестящий штрих может иметь *жирный блеск, блеск застывающего сала, влажный блеск*. Штрих также может быть *матовым, мучнистым*.

*Пигментация штриха.* Пигментацию лучше наблюдать в отраженном свете. Необходимо различать окраску самого штриха и возможное выделение пигмента в агар. Цвет культуры может быть различным, обычно пигментация соответствует пигментации колонии, из которой осуществлялся посев штриха.

*Консистенция культуры.* Определяется при снятии материала с агара для приготовления препарата. Она может быть *слизистой, тягучей, пастообразной, сухой* и т. п.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Освоить технику анализа роста культуры по штриху. Владеть техникой выделения чистой культуры методом предельных разведений Коха. Осуществить посев клона из разведения 1:100000.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; чашки Петри с МПА; стерильные шпатели, пипетки, пробирки со стерильной дистиллированной водой, бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой. Термостат для выращивания бактерий.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; раствор водного фуксина; капельница с дистиллированной водой для приготовления препарата; х/б ткань для микроскопа и стеклов; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Накопительные культуры бактерий, выращенные из посевов, осуществленных на предыдущем занятии.

### Задание 1. Приготовление разведений клеточной суспензии

1. Небольшое количество накопительной культуры в стерильных условиях взять на бактериологическую петлю и поместить в первую пробирку со стерильной дистиллированной водой.

2. В стерильных условиях 1 мл суспензии перенести пипеткой во вторую пробирку со стерильной дистиллированной водой.

3. Операцию повторить до получения последнего разведения (см. рис. 16).

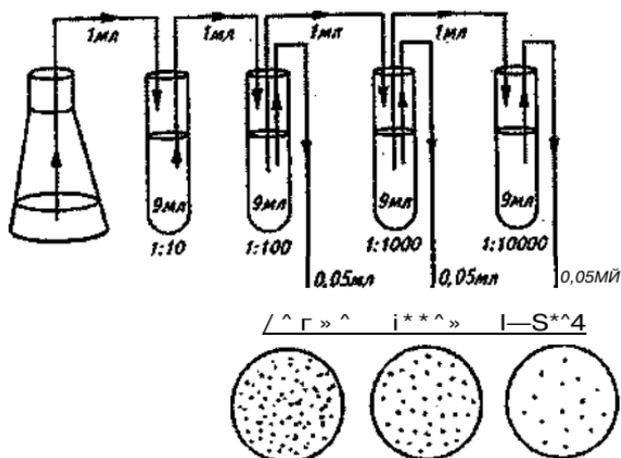


Рис. 16. Схема приготовления разведений и проведения посевов

Задание 2. Посев клона из разведения 1: 100000

1. Проведите посев на чашку Петри с агаризованной средой 0,1 мл из последнего разведения.

2. Распределите суспензию по поверхности агара стерильным шпателем. Чашка должна находиться в стерильной зоне, крышка приоткрывается со стороны горелки. При посеве анаэробов сначала наносится суспензия и распределяется по дну стерильной чашки, затем заливается агар с температурой 40°C.

3. Заверните чашки крышкой вверх и поместите в термостат на выращивание.

4. Звпишите в тетради условия посева и выращивания клона.

Задание 3. Подготовка и микроскопирование постоянного препарата накопительной культуры

1. Приготовьте предметное стекло и поместите его на мостик кристаллизатора.

2. Сделайте постоянный препарат накопительной культуры и окрасьте его водным фуксином.

3. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15x90 в иммерсионной системе.

4. Сделайте рисунок постоянного препарата накопительной культуры, отметив однородность культуры, форму и относительные размеры клеток, образование характерных скоплений.

5. Сдайте рабочее место лаборанту.

6. Подпишите лабораторное занятие у преподавателя.

### Занятие № 9

Анализ чистоты клона бактерий.

Посев и выращивание чистой культуры

*Описание выросших клонов.* Клон - потомство одной клетки, образующее на агаризованной среде колонию, культуральные признаки которой соответствуют данному виду микроорганизмов. Следует отметить, что культуральные признаки имеют различную диагностическую ценность для различных групп микроорганизмов. Например, для грамотрицательных энтеробактерий, не выделяющих пигменты, рост на обычных агаризованных средах типа МПА не имеет значительной ценности для идентификации. А у такого представительного рода спорообразующих грамположительных палочковидных бактерий, как *Bacillus*, культуральные признаки могут помочь в дифференцировании вплоть до вида (см. Часть I).

При описании выросших колоний необходимо обратить внимание на следующие признаки: 1) количество выросших колоний; 2) форму и размеры колоний; 3) край и профиль колоний; 4) цвет и структуру колоний; 5) блеск, прозрачность и консистенцию.

Удачными чашки с клонами считаются при условии наличия однородных колоний. Число колоний не должно превышать 5-8, должен отсутствовать газонный рост. При микроскопировании в препарате не должно обнаруживаться посторонних клеток, нехарактерных скоплений клеток.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ и описание роста клона. Посев в чистую культуру.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; пробирка со скошенным агаром или со столбиком (для анаэробов), бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой. Термостат для выращивания бактерий.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; раствор водного фуксина; капельница с дистиллированной водой для приготовления препарата; х/б ткань для микроскопа и стеклов; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Выращенные клоны бактерий из посевов осуществленных на предыдущем занятии.

### **Задание 1. Анализ и описание роста клона**

1. Рассмотрите и проведите подсчет выросших колоний. Если колоний много, они неоднородные или присутствует газонный рост, процедуру выделения клона (описана в предыдущем занятии) необходимо повторить.

2. Если выросшие клоны соответствуют требованиям, проведите описание колоний по обычной схеме. Запишите данные в тетрадь.

### **Задание 2. Микроскопическая оценка чистоты клона**

1. Приготовьте постоянный препарат клона с окраской водным фуксином.

2. Промикроскопируйте препарат, увеличение 15х90 в иммерсионной системе.

3. Сделайте рисунок и отметьте все признаки, имеющие значение для идентификации (форму и относительные размеры клеток, наличие характерных скоплений клеток).

### Задание 3. Посев чистой культуры бактерий из клона

1. Проведите посев небольшого количества клеток из колонии клона на поверхность скошенного агара методом штриха (аэробы) или вглубь агара столбика методом укола (анаэробы) бактериологической петлей. Все манипуляции выполняются в стерильной зоне горелки.

2. Промаркируйте пробирки и поместите их на выращивание в термостат, 28-30°C.

3. Запишите в тетради условия посева и выращивания чистой культуры.

4. Уберите и сдайте лаборанту свое рабочее место.

5. Подпишите лабораторное занятие у преподавателя.

### Занятие № 10

#### Анализ чистой культуры бактерий. Окраска по методу Грама

*Визуальный контроль.* При просматривании роста в пробирках необходимо убедиться в однородности роста по всему штриху или уколу, отсутствии посторонней пигментации или нехарактерных данной культуре признаков.

*Микроскопический контроль.* При микроскопировании постоянно-го препарата, приготовленного из материала чистой культуры, не должно выявляться никаких посторонних клеток нехарактерной формы, размеров или не обнаруживаемых ранее клеточных скоплений. Однако необходимо помнить, что морфологические признаки могут зависеть от возраста культуры и условий культивирования, некоторые культуры полиморфны.

*Окраска по методу Грама.* Метод окраски предложен датским врачом Христианом Грамом в 1884 году. Им было замечено, что при окраске генциан-виолетом краситель способен задерживаться в поверхностных структурах одних бактерий и легко вымывается спиртом у других. Следовательно, при вторичной окраске, например, водным фуксином или нейтральным красным часть бактерий остается фиолетовой (по первичному красителю), а часть окрашивается в красный цвет. Бактерии, сохраняющие первичную окраску генциан-виолетом, обозначаются как грамположительные, а окрашивающиеся вторично в красный цвет - грамотрицательными. Позднее была открыта причина такого характера окраски. Оказалось, что у грамположительных бактерий клеточная стенка содержит значительное количество пептидгликана, слой которого непосредственно связан с ЦПМ. Генциан-виолет формирует комплексные соединения с пептидгликановым слоем, которые укрепляются реакцией с йодом в ячейках пептидгликанового слоя и полностью не вымываются этанолом. У грамотрицательных бактерий пептидгликановый слой тонкий и не связан с мембраной, краситель там не удерживается. Однако для точной оценки результатов окраши-

вания необходимо соблюдать несколько правил: окраску проводить у молодых культур, в старых культурах результаты могут искажаться; окрашивать тонкие мазки (из толстых краситель хуже вымывается); строго придерживаться процедуры окраски; использовать контрольные культуры, мазки которых наносятся на то же стекло, что и анализируемый мазок.

*Метод окраски по Граму.* На одно обезжиренное предметное стекло наносятся три мазка: слева и справа - контрольных культур, окраска которых по методу Грама хорошо известна, а в центр - изучаемой культуры. Мазки высушиваются на воздухе и фиксируются в пламени горелки. На мазки наносят генциан-виолет на 1–2 минуты. Краситель сливают, мазки не промывают водой, а наносят раствор Люголя также на 1-2 минуты до почернения. Раствор Люголя сливают и мазки промывают этиловым спиртом, погружая в стакан трижды одной стороной и, перевернув, трижды другой стороной. Для предотвращения излишнего вымывания красителя к спирту прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора йода на 100 мл 96 %-ного этанола. Затем препарат промывается водой и дополнительно окрашивается водным фуксином или нейтральным красным в течение 3-4 минут.

При правильном окрашивании грамположительные бактерии остаются окрашенными в фиолетовый цвет, грамотрицательные окрашиваются в розово-красный.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ чистоты культуры. Освоение метода окраски бактерий по Граму. Идентификация чистой культуры по методу Грама.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; пробирка со скошенным агаром или со столбиком (для анаэробов), бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой, пинцет.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; раствор водного фуксина; капельница с дистиллированной водой для приготовления препарата; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, красители: генциан-виолет, раствор Люголя. Спирт для промывки мазков в стакане.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха. Контрольные культуры *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*

### **Задание 1. Анализ роста чистой культуры**

1. Проведите визуальный контроль роста бактерий по штриху.
2. Опишите культуральные признаки роста чистой культуры по штриху или уколу, используя схему из занятия № 8.
3. Запишите характеристику роста чистой культуры в тетрадь.

## Задание 2. Окраска по методу Грама

1. Приготовьте обезжиренное предметное стекло.
2. Нанесите три капли дистиллированной воды на одно стекло: справа, слева и по центру. Важно, чтобы капли были на расстоянии 1,5 см друг от друга и не менее 1 см от края стекла (рис. 17).
3. Сделайте тонкие мазки контрольных культур бацилл и ишерихии справа и слева, анализируемой культуры - по центру (рис.17). Зафиксируйте высохшие мазки.
4. Проведите окраску по приведенному выше описанию.

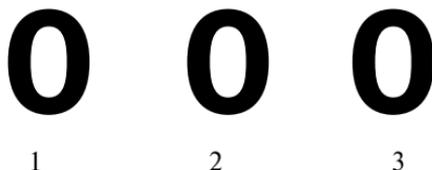


Рис. 17. Расположение мазков на стекле при окраске по Граму.  
1 и 3 - контрольные штаммы; 2 - выделенный штамм

## Задание 3. Микроскопирование и анализ окраски

1. Промикроскопируйте мазки. Увеличение 15х90 в иммерсионной системе.
2. Сравните окраску идентифицируемой культуры с контрольными культурами: бациллы имеют грамположительную окраску, ишерихии - грамотрицательную.
3. Сделайте рисунки' постоянного препарата окраски по Граму (рис. 18). Запишите характер окраски выделенных штаммов.
4. Уберите рабочее место. Сдайте чистые культуры лаборанту для дальнейших работ.

*Примечание.* В случае сомнительного характера окраски рекомендуется сделать пересев в новую среду и использование 24-часовой культуры для экспресс-тестирования.

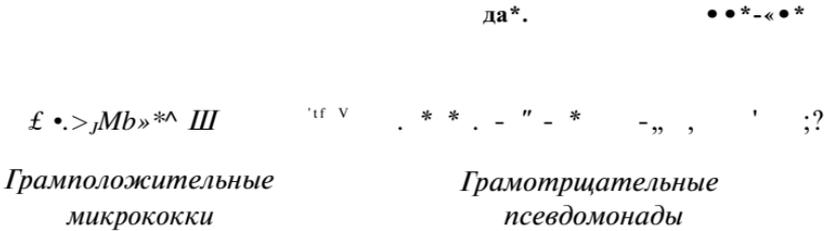


Рис. 18. Окраска по методу Грама

*Экспресс-метод определения грам-типа микроорганизмов по Крегенсену.* Метод основан на разрушении клеток грамотрицательных бактерий в щелочной среде и определении свободной ДНК.

На предметное стекло нанести каплю 3 %-ного раствора КОН и поместить в нее исследуемые бактерии на бактериологической петле. Хорошо перемешать. Через 5-6 секунд при передвижении петли по стеклу в случае грамотрицательных бактерий образуется слизистый слой длиной 1-2 см. Если слизь не образуется - культура грамположительная.

### Занятие № 11

#### Выявление углеводных внутриклеточных включений бактерий

Бактерии накапливают запасные питательные соединения в клетках при благоприятных условиях среды и избытке пищи. Полисахаридные включения накапливаются в виде крахмалоподобных (гранулезы) или гликогеноподобных углеводов. Чаще всего это гранулы сферической формы диаметром от 20 до 100 нм. Гранулеза - специфический запасной полисахарид анаэробных спорообразующих палочек из рода клостридий, осуществляющих маслянокислое брожение.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Выявление углеводных включений у выделенных штаммов бактерий, а также у дрожжей. Освоение метода прижизненной окраски углеводных запасных соединений.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; пробирка со скошенным агаром или со столбиком (для анаэробов), бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, раствор Люголя.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха; культура *Saccharomyces cerevisiae*.

Задание 1. Окраска углеводных включений дрожжей

1. Приготовьте чистое обезжиренное предметное стекло. Нанесите каплю раствора Люголя.

2. Внесите в нее небольшое количество культуры дрожжей на бактериологической петле.

3. Накройте чистым покровным стеклом. Избыток жидкости уберите фильтровальной бумагой.

4. Промикроскопируйте прижизненный препарат с увеличением 15х90 в иммерсионной системе.

5. Сделайте рисунок, проанализировав несколько полей зрения. Обозначьте гликогенopodobные включения дрожжевых клеток. Отметьте также форму клеток, ядра, наличие делящихся и/или почкующихся клеток дрожжей.

Задание 2. Окраска углеводных включений выделенных штаммов бактерий

1. Приготовьте предметное стекло, поместите на мостик кристаллизатора.

2. Нанесите каплю раствора Люголя. На бактериологической петле внесите культуру бактерий.

3. Накройте покровным стеклом, избыток жидкости уберите фильтровальной бумагой.

4. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15х9Р в иммерсионной системе.

5. Сделайте рисунок и обозначьте обнаруженные углеводные включения (если есть). Укажите также и другие признаки клеток: форму, характер скоплений.

Задание 3. Пересев на новую питательную среду

1. Небольшое количество культуры возьмите на бактериологическую петлю.

2. Сделайте посев на поверхность скошенного агара методом штриха в случае аэробности бактерий или методом укола вглубь среды в случае факультативной анаэробности.

3. Поместите пробирки на выращивание в термостат. Сдайте старые пробирки лаборанту.

4. Уберите свое рабочее место.

*Примечание.* Все манипуляции с культурами микроорганизмов выполняются в стерильной зоне горелки с целью предотвращения их засорения.

Задание 4. Коллоквиум по пройденным темам

*Вопросы к коллоквиуму*

1. Проблемы систематики бактерий.

2. Нумеристическая таксономия. Исторические истоки.

3. Компьютеризация нумеристической таксономии. Современное применение.

4. Хемотаксономия. Достоинства и недостатки.

5. Генотаксономия. Поиски наиболее надежного критерия. Особенности филогении прокариот.

6. Деление прокариот на отделы по особенностям строения клеточной стенки.

*Занятие № 12*

**Окраска липидных внутриклеточных скоплений**

У дрожжей и других микроскопических эукариотов жиры накапливаются в виде капелек триглицеридов, тогда как у бактерий жировые включения представляют собой гранулы *поли-Р-оксимасляной кислоты*. Гранулы окружены однослойной белковой оболочкой толщиной 2-3 нм. Большое количество гранул поли-Р-оксимасляной кислоты накапливают бациллы, хотя они обнаруживаются и у большинства других бактерий. Капли жира и гранулы хорошо преломляют свет и видны в световой микроскоп. Окраска липофильными красителями *судан 3* и *черный В* делает их еще более заметными.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Выявление липидных включений у выделенных штаммов бактерий, а также у дрожжей. Освоение метода прижизненной окраски запасных липидных соединений.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, раствор судана 3 в молочной кислоте.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха. Культура *Saccharomyces cerevisiae*.

Задание 1. Окраска липидных включений дрожжей

1. Приготовьте предметное стекло и нанесите на него каплю судана 3.
2. Поместите небольшое количество культуры дрожжей на петле в каплю красителя. Накройте покровным стеклом. Излишки уберите фильтровальной бумагой.
3. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.
4. Сделайте рисунок препарата. Отметьте наличие капель жира и другие структуры: ядра, гранулы, а также присутствие делящихся и/или почкующихся клеток.

Задание 2. Окраска липидных включений выделенных штаммов

1. Приготовьте предметное стекло и нанесите на него каплю судана 3.
2. Поместите небольшое количество культуры выделенных бактерий на петле в каплю красителя.
3. Накройте покровным стеклом. Уберите избыток жидкости фильтровальной бумагой.
4. Промикроскопируйте с увеличением 15х90 в иммерсионной системе.
5. Сделайте рисунки препаратов и отметьте наличие гранул поли-р-оксимасляной кислоты и другие морфологические особенности культур: форму клеток, характерные скопления.
6. Сдайте пробы с культурами на хранение лаборанту. Уберите свое рабочее место.

Задание 3. Коллоквиум по систематике бактерий

*Вопросы к коллоквиуму*

1. Отдел фирмикутных бактерий. Класс фирмибактерий.
2. Грамположительные аэробные и факультативно анаэробные кокки.

3. Анаэробные кокки.
4. Грамположительные аэробные спорообразующие палочки и кокки.
5. Грамположительные палочки, не образующие спор.
6. Отдел фирмикутных бактерий. Класс таллобактерий.
7. Группа коринеформных бактерий.
8. Группа пропионовокислых бактерий.
9. Группа актиномицетов. Семейства *Actinomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Frankiaceae*.
10. Группа актиномицетов. Семейства *Actinoplanaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomycelaceae*.

### Занятие № 13

#### Выявление волютиновых включений у дрожжей и бактерий

Термин «волютин» был впервые предложен микробиологом Мейером, который обнаружил окрашивающиеся гранулы у бактерии *Spirillum volutans*. Впоследствии подобные включения были выявлены у микроскопических грибов и большинства бактерий. Диаметр гранул составляет 500 нм, они окрашиваются основными красителями, причем цвет гранул отличается от окраски применяемого красителя (метахроматизм). По химической природе волютиновые гранулы (зерна) представляют собой *полифосфаты*, в которых остатки ортофосфорной кислоты соединены фосфоангидридными связями.

Полифосфаты играют роль депо фосфатов (соли фосфатов в основном нерастворимы и поэтому малодоступны) и макроэргических соединений, поскольку содержат нестабильные фосфоэфирные связи. В настоящее время роль волютиновых зерен в регуляции пула адениновых нуклеотидов: АТФ, АДФ и АМФ, а также неорганического фосфата у микроскопических грибов и бактерий интенсивно исследуется.

**Окраска полифосфатов по методу Омелянского.** Окраску волютиновых включений у бактерий эффективно проводить по методу Омелянского. На обезжиренном предметном стекле готовят мазок бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют. После фиксации на мазок наносят карболовый фуксин Циля на 30 секунд. Затем препарат промывают водой и наносят 1 %-ный раствор серной кислоты на 20-30 секунд для обесцвечивания. Кислоту сливают, препарат снова промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим 1 :40 в течение 30 секунд. Препарат еще раз промывают водой и микроскопируют при увеличении 15х90 с иммерсионной системой. Зерна волютина имеют красный цвет на фоне синей цитоплазмы клеток бактерий.

**Окраска волютина у дрожжей.** Фиксированный в пламени горелки мазок окрашивают метиленовым синим по Лёффлеру в течение 3 минут. Препарат промывают водой и, не высушивая, наносят небольшую каплю

1 %-ного раствора серной кислоты. Суспензию накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микро-скопируют при увеличении 15х90 с иммерсией. Волютин имеет вид капель сине-фиолетового цвета на слабо-голубом фоне цитоплазмы дрожжевых клеток.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Выявление волутиновых включений у выделенных штаммов бактерий, а также у дрожжей. Освоение метода окраски волютина по Омелянскому и Лёффлеру.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, раствор метиленового синего 1 : 40 и по Лёффлеру; карболовый фуксин Циля.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха; культура *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Задание 1. Окраска волютина у бактерий по методу Омелянского**

1. Приготовьте предметное стекло для мазка.
2. Сделайте тонкий мазок культуры и зафиксируйте его.
3. Осуществите окраску мазка по приведенному выше описанию метода Омелянского
4. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15х90 с иммерсией.
5. Сделайте рисунок препарата и отметьте все его характерные особенности.

### **Задание 2. Окраска зерен волютина у дрожжей**

1. Приготовьте предметное и покровное стекло для мазка.
2. Сделайте тонкий мазок культуры и зафиксируйте его.
3. Проведите окраску мазка по описанию окраски волютина у дрожжей метиленовым синим Лёффлера.
4. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15х90 с иммерсией.
5. Сделайте рисунок препарата и отметьте все его характерные особенности.
6. Сдайте культуры лаборанту. Уберите свое рабочее место.

Задание 3. Коллоквиум по систематике бактерий. Грациликутные бактерии

*Вопросы к коллоквиуму*

1. Класс *Proteobacteria* (*Scotobacteria*).
2. Спирохеты.
3. Аэробные спиральные и вибрионоподобные грамотрицательные бактерии.
4. Аэробные грамотрицательные палочки и кокки.
5. Факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки.
6. Анаэробные грамотрицательные прямые и изогнутые спиральные палочки.
7. Грамотрицательные хемолитотрофные бактерии.
8. Хламидобактерии. Риккетсии и хламидии.
9. Почкующиеся или стебельковые бактерии.

*Занятие № 14*

Выявление эндоспорообразования у бактерий

Грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* обладают свойством эндоспорообразования. При неблагоприятных условиях - уменьшения питательных веществ в среде, накопления продуктов обмена, увеличения количества бактериальных клеток - внутри клеток начинается процесс накопления дипикалиновой кислоты, ионов  $Ca^{2+}$  и формирования споры или реже нескольких спор. Различают несколько типов спорообразования: *бациллярный*, *кlostридиальный*, *плектридиальный*, *латеральный*.

*Бациллярный тип* спорообразования характеризуется тем, что спора не превышает диаметра клетки и клетка не изменяет своей изначальной формы. Спора (реже 2-3 споры) может располагаться *центрально*, *полярно* или *субполярно*.

*Кlostридиальный тип* спорообразования связан с увеличением диаметра споры по отношению к первоначальному диаметру вегетативной бактериальной клетки, поэтому клетка раздувается. Спора располагается по центру клетки.

*Плектридиальный тип*. Диаметр споры больше диаметра вегетативной клетки, спора располагается на одном конце клетки. Клетка приобретает вид барабанной палочки.

*Латеральный тип*. Спора смещена к одной стороне клетки, из-за чего клетка раздувается с одного бока (Часть I, рис. 6).

Обнаружение и окраску эндоспор лучше проводить на старых культурах. При обычных способах окраски споры, имеющие дополнительные

толстые оболочки, краситель не берут или слабо прокрашиваются, поэтому имеют вид светлых включений внутри окрашенных частей еще сохранившейся вегетативной клетки.

**Способ окраски спор по методу Ожешки.** На обезжиренное предметное стекло нанести тонкий мазок, высушить на воздухе. Не фиксируя, залить 0,5 %-ным раствором соляной кислоты. Подогреть препарат, держа пинцетом над пламенем горелки на высоте 10 см в течение 2 минут до появления паров. Остатки кислоты слить, препарат поместить на мостик кристаллизатора и осторожно промыть водой. Мазок покрыть фильтровальной бумагой и нанести на нее карболовый фуксин Циля до хорошей пропитки. Подогревать над пламенем горелки на протяжении 5 минут, добавляя краситель по мере его высыхания. Препарат поместить на кристаллизатор, бумагу удалить и промыть препарат водой. Залить препарат 1 %-ной серной кислотой, выдержать в течение 2 минут для обесцвечивания. Указано среднее время обесцвечивания, которое может несколько изменяться в зависимости от особенностей микроорганизмов и толщины мазка.

После обесцвечивания препарат снова промыть водой и докрасить метиленовым синим 1:40 в течение 10-15 минут. Затем препарат промывается водой, высушивается фильтровальной бумагой и микроскопируется. При правильном окрашивании споры красные (сохраняют окраску фуксином Циля), а цитоплазма клеток и вегетативная клетка без споры — синие.

**Способ окраски спор по методу Пешкова.** Тонкий мазок высушить на воздухе и фиксировать в пламени горелки. На фиксированный мазок нанести раствор метиленового синего по Лёффлеру. Держа мазок над пламенем горелки пинцетом, довести краситель до кипения и кипятить 15-20 секунд. По мере испарения можно добавить краситель. Препарат осторожно поместить на мостик кристаллизатора и после остывания промыть водой. Клетки докрасить водным фуксином в течение 30 секунд. Бактериальные клетки выглядят красными, а споры - синими.

При обнаружении эндоспорообразования необходимо отметить тип спорообразования, расположение споры внутри клетки и форму спор (округлая, эллипсоидная или продолговатая).

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Выявление наличия или отсутствия эндоспорообразования у выделенных штаммов бактерий.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги. Красители: карболовый фуксин Циля; метиленовый синий 1:40; метиленовый синий по Лёффлеру, водный фуксин. Реагенты: 0,5 %-ный раствор HCl, 1 %-ный раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Вода для приготовления и промывки препаратов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31, бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой, пинцет.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха; контрольная культура *Bacillus subtilis*.

Задание 1. Окраска эндоспор по методу Ожешки

1. На одно предметное стекло нанесите мазки своих штаммов (слева и справа) и по центру - мазок контрольной культуры *Bacillus subtilis*.

2. Осуществите окраску препарата, строго следуя описанию метода окраски по Ожешки.

3. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.

4. Сделайте отдельные рисунки контрольной культуры и своих штаммов (три рисунка). Отметьте все характерные особенности: форму клеток, характер скоплений, наличие эндоспорообразования (или его отсутствие).

5. В случае обнаружения эндоспорообразования отметьте форму спор, расположение их в клетке и тип спорообразования.

Задание 2. Окраска эндоспор по методу Пешкова

1. На одно предметное стекло нанесите мазки своих штаммов (слева и справа) и по центру - мазок контрольной культуры *Bacillus subtilis*.

2. Осуществите окраску препарата, строго следуя описанию метода окраски по Пешкову.

3. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.

4. Сделайте отдельные рисунки контрольной культуры и своих штаммов (три рисунка). Отметьте все характерные особенности: форму клеток, характер скоплений, наличие эндоспорообразования (или его отсутствие).

5. В случае обнаружения эндоспорообразования отметьте форму спор, расположение их в клетке и тип спорообразования.

6. Уберите свое рабочее место. Сдайте культуры лаборанту на сохранение для дальнейшей работы.

## **Тема 3. Изучение физиолого-биохимических признаков выделенных бактерий**

### *Занятие М 15*

#### **Посев чистых культур на дифференциально-диагностические среды Гисса**

**Характеристика сред Гисса.** Посев на среды Гисса используется для определения сахаролитических способностей выделенных культур бактерий. Основу среды составляет 0,5 %-ный пептон и 0,1 %-ный  $K_2HPO_4$ . Углеводы добавляются в количестве 1%. Обычно используются среды с добавлением глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, фруктозы, ксилозы, арабинозы, галактозы, рамнозы; спиртов: глицерола, сорбита, маннита и др. Изменение рН среды за счет образования кислых продуктов фиксируется с помощью добавленного в среду индикатора. Водный розовый имеет в кислой среде синюю окраску, а бромкрезоловый пурпурный и бромтимоловый синий - желтую окраску. Чтобы обнаружить газообразование, в пробирки с твердыми средами делают посев уколом, а в жидкую среду опускают поплавки (запаянные с одного конца специальные трубочки) запаянным концом вверх.

Среды с углеводами засевают одновременно. Результаты фиксируют через 48-96 часов (3-суточный рост).

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Ознакомление с дифференциально-диагностическими средами Гисса. Осуществление посевов выделенных штаммов на среды Гисса с углеводами.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Среды Гисса с глюкозой, фруктозой, мальтозой. Лактозой, маннитом и другие в пробирках (столбики), 2/3 пробирки. Бактериологические петли, горелки.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха.

#### **Задание 1. Характеристика используемых для посева сред, фиксация условий посева и выращивания**

1. Занесите в тетрадь характеристику сред: а) состав; б) цвет; в) консистенцию.
2. Укажите присутствующие индикаторы и их окраску в кислой, нейтральной и щелочной среде.
3. Запишите условия и способ посева, а также условия выращивания.

Задание 2. Посев выделенных штаммов на дифференциально-диагностические среды Гисса

1. Отберите небольшое количество культуры на бактериологическую петлю.
2. Сделайте посев в столбик среды методом укола вглубь среды.
3. Осуществите посев тем же методом и на другие среды Гисса.
4. Промаркируйте пробирки и поместите на выращивание в термостат
5. Уберите свое рабочее место.

*Примечание.* Все операции осуществляются в стерильной зоне горелки.

Задание 3. Коллоквиум по систематике бактерий. Тенерикутные и мендосикутные бактерии

#### *Вопросы к коллоквиуму*

1. Общая характеристика микоплазм.
2. Семейство *Mycoplasmataceae*.
3. Семейство *Spiroplasmataceae*.
4. Семейство *Acholeplasmataceae*.
5. Общая характеристика архебактерий.
6. Метаногены.
7. Аэробные сероокисляющие и анаэробные серовосстанавливающие археи.
8. Галобактерии.
9. Термофильные и ацидофильные археи.

#### *Тренинг-тесты по систематике бактерий*

1. Бактерия имеет палочковидную форму, обитает в толстом кишечнике человека, грам(-), факультативный аэроб, вызывает язвенный колит. Назовите род, вид, к какому отделу, классу она относится?

2. Бактерия обитает глубоко в почве, грам(+), анаэроб, образует эндоспоры; попав в кровь, вызывает опасное заболевание, нередко с летальным исходом. Попадание в пищу ведет к выделению токсинов, вызывающих легкое отравление. Санитарно-показательный организм для продуктов питания. Назовите род, вид, к какому отделу и классу она относится?

3. Грам (-) палочка, относится к энтеробактериям. Природные очаги обнаруживаются в Индии, вызывает смертельное заболевание у человека, свирепствовавшее в Средние века. Назовите род, вид, к какому отделу и классу она относится?

4. Бактерии живут глубоко в почве, строгие анаэробы. Образуют эндоспоры, диаметр которых в основном больше диаметра клетки. Вырабатывают смертельно опасный токсин, при попадании в организм человека тормозящий проведение нервного импульса. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

5. Бактерии имеют аксиальные нити в периплазматическом пространстве. Паразит, обитает в организме человека, вызывает тяжелое системное заболевание. Передается половым и бытовым путем. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

6. Бактерии живут в толстом кишечнике человека. Грам (+) ветвящиеся палочки, анаэробы, полезные симбионты. Непатогенны ни при каких условиях. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

7. Бактерия окрашивается грам(-), палочка правильной формы, обитает в толстом кишечнике человека, использует простые органические соединения. Факультативный аэроб. Условно патогенны. Санитарно-показательный микроорганизм. Назовите род, вид, к какому отделу и классу она относится?

8. Бактерии грам(+), неподвижны, молодые клетки ветвятся, старые изогнуты. Образуют небольшой мицелий, гифы которого распадаются на отдельные фрагменты. Вызывают тяжелое заболевание, впервые идентифицированы Р. Кохом. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся? Какое еще тяжелое заболевание вызывают представители этого рода?

9. Бактерия грам(-), плеоморфная мелкая палочка. Обнаруживается в ротовой полости и кишечнике человека. Анаэроб, условно патогенна. Увеличение числа этих бактерий в толстом кишечнике - признак дизбактериоза. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

10. Бактерии окрашиваются грам(+), неподвижные палочки, имеющие на концах утолщения в виде булавы (гранулы волютина). Факультативные анаэробы. В организме человека размножаются на миндалинах, выделяют смертельно опасный токсин. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

11. Бактерия имеет изогнутую форму, подвижна за счет полярного жгутика. Обитатель пресных водоемов Средней Азии, Индии. Распространяется с питьевой водой, вызывает заболевание, сопровождающееся обезвоживанием. Назовите род, вид, к какому отделу и классу она относится?

12. Грам(-) бактерия, имеет кокковидную форму, образует скопления в виде диплококков. Передается половым и бытовым путем, вызывает венерическое заболевание. Назовите род, вид, к какому отделу и классу она относится?

13. Грам(+) кокки, мелкие, образуют цепочки клеток, так как делятся в одной плоскости. Условно или безусловно патогенны, виновники многих заболеваний человека. Назовите род, к какому отделу и классу они относятся? Назовите виды, вызывающие заболевания у человека, или перечислите заболевания, которые они вызывают.

**14.** Бактерии имеют кокковидную форму, делятся в трех плоскостях с одинаковой скоростью, отличаются высокой потребностью в питательных соединениях, факультативные анаэробы. Живут на поверхности растений (эпифитная микробиота), на питательных средах образуют колонии желтого цвета. Назовите род, вид, к какому отделу и классу они относятся?

### *Занятие №16*

#### **Анализ посевов на среды Гисса.**

##### **Посев на среды с желатином и крахмалсодержащую среду**

**Использование углеводов.** Различные микроорганизмы характеризуются различной способностью использовать те или иные углеводные соединения как источники энергии и углерода. Для идентификации гетеротрофов важно определить, какие углеводы используются и какие продукты обмена при этом образуются.

Присутствие газообразования можно отметить по наличию разрывов и пузырьков внутри столбика среды и/или вспенивания на поверхности агара. При помещении в пробирку с жидкой средой поплавка газ заполняет его, вытесняя среду.

Накопление в среде органических кислот — подкисление — приводит к изменению цвета индикатора, добавленного к среде Гисса.

**Отношение к кислороду.** Облигатные аэробы растут на поверхности агара, роста по проколу нет, или он еле заметен. Микроаэрофилы характеризуются ростом в виде «гвоздя». Факультативные анаэробы растут равномерно по всему проколу, аэротолерантные анаэробы в большей степени внизу прокола, а облигатные - только на дне пробирки.

**Посев на мясо-пептонную среду с желатином.** Посев осуществляется с целью обнаружения протеолитической активности микроорганизмов. Среда готовится на основе мясо-пептонного бульона с добавлением желатина в концентрации 10-15%. Посев осуществляется проколом в пробирку, наполненную на 2/3 средой, и выращивание проводят при комнатной температуре в течение 3-7 суток.

**Посев на среду с крахмалом.** Посев позволяет обнаружить образование и выделение в окружающую среду или периплазматическое пространство амилолитических ферментов. Среда содержит пептон,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , крахмал и агар-агар. Среда после стерилизации разливается в стерильные чашки Петри, посев осуществляется штрихом по поверхности агара. Выращивание в термостате в течение 2–7 суток.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Ознакомление с дифференциально-диагностическими средами - желатином и крахмалом. Осуществление посевов выделенных штаммов на мясо-пептонный желатин и агаризованную среду с крахмалом.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Пробирки, заполненные на 2/3 мясо-пептонным желатином. Чашки Петри с крахмалсодержащим агаром. Бактериологические петли, горелки. Спирт-эфирная смесь для протирки объекта; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, дистиллированная вода для приготовления препаратов, раствор водного фуксина.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чистые культуры, выделенные из почвы и воздуха, выросшие на средах Гисса.

### **Задание 1. Анализ роста культур на средах Гисса с углеводами**

1. Внимательно рассмотрите пробирки с посевами и внесите данные в таблицу.

2. Сделайте выводы об интенсивности использования тех или иных углеводов, отношении бактерий к кислороду, наличию или отсутствию газообразования (табл. 1).

*Таблица 1*

*Показатели роста выделенных культур на средах Гисса с углеводами*

Показатели	С глюкозой	С фруктозой	С лактозой	С мальтозой	С маннитом	С сорбитом
<b>Цвет</b> До посева После посева						
<b>Консистен.</b> До посева После посева						
Образование газа						
Интенсивность и характер роста						
<b>Выводы</b>						

## **Задание 2. Микроскопический анализ роста культур**

1. Приготовьте постоянные препараты из всех пробирок со средами Гисса.
2. Окрасьте препараты водным фуксином.
3. Промикроскопируйте с увеличением 15х90 в иммерсионной системе.
4. Сделайте рисунки. Отметьте все характерные особенности культур, их чистоту или наличие засора. В случае засора результаты роста на среде с засором учитывать нельзя.

## **Задание 3. Посев выделенных бактерий на среду с желатином и крахмалом**

1. Запишите в тетрадь характеристику среды с желатином: цвет, консистенцию.
2. Осуществите посев культур на среду с желатином методом прокола вглубь среды.
3. Осуществите посев на чашки Петри с агаризованным крахмалом методом штриха по поверхности агара.
4. Промаркируйте пробирки и чашки и поставьте на выращивание: пробирки при комнатной температуре, чашки при температуре 28—30°C в термостат.
5. Оставьте культуры на одной из сред Гисса в холодильнике до пересева.

### *Занятие № 17*

#### **Анализ посевов культур на среду с желатином и агаризованным крахмалом**

**Разжижение желатина.** Наличие изменения консистенции мясопептонного желатина свидетельствует о способности микроорганизмов выделять протеолитические ферменты в окружающую среду. Внеклеточные протеазы выделяются грибами и многими грамположительными бактериями: бациллами, актиномицетами. Разжижение может быть послойным, воронкообразным, мешковидным, пузырчатым.

**Гидролиз крахмала.** Ряд микроорганизмов выделяет в окружающую среду амилолитические ферменты - амилазы. Активно продуцируют амилазы бациллы, мицелиальные грибы. Гидролиз крахмала обнаруживают по зоне просветления среды вдоль штриха или вокруг колоний. Для обнаружения зоны просветления проводят обработку чашки Петри раствором Люголя. Если вокруг штриха или колоний нет синей окраски, то амилолитическая активность обнаруживается. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилолитическая активность культуры.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ роста культур на мясо-пептонном желатине и агаризованном крахмале. Обнаружение протеолитической и амилолитической активности культур. Пересев на МПА.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, дистиллированная вода для приготовления препаратов, раствор водного фуксина, раствор Люголя. Пробирки с МПА: столбики для факультативных анаэробов и скошенный агар для аэробов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Пробирки с посевами на мясо-пептонный желатин и чашки Петри с посевами на агаризованный крахмал, а также культуры на одной из сред Гиса.

Задание 1. Анализ роста культуры на среде с желатином

1. Рассмотрите пробы с желатином. Отметьте интенсивность роста и консистенцию среды. При наличии разжижения желатина отметьте его характер, внесите данные в тетрадь.

2. Сделайте постоянный препарат с окраской водным фуксином.

3. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15х90 в иммерсионной системе.

4. Зарисуйте препарат и отметьте характерные особенности культуры: форму клеток, скопления клеток. Убедитесь, что культура чистая.

Задание 2. Анализ роста на агаре с крахмалом

1. Сделайте постоянный препарат с культуры, выросшей на чашке Петри. Окрасьте фуксином.

2. Промикроскопируйте препарат с увеличением 15х90 в иммерсионной системе. Убедитесь в чистоте культуры.

3. Нанесите раствор Люголя на чашку Петри. При наличии светлой зоны измерьте ее диаметр. Отметьте в тетради наличие или отсутствие амилолитической активности.

Задание 3. Пересев культур на свежую среду

1. Убедившись в чистоте культур, сделайте пересев части культуры со среды Гисса на скошенный агар (штрихом) или в столбик (уколом вглубь среды).

2. Поместите пробы на выращивание в термостат при температуре 28-30°С.

3. Уберите свое рабочее место. Сдайте старые культуры лаборанту.

**Определение чувствительности выделенных штаммов  
к антибиотикам**

Антибиотики - природные или синтетические соединения, обладающие свойствами ингибировать или полностью прекращать рост и жизнедеятельность организмов. По спектру действия их делят на антибактериальные (их обнаружено и синтезировано больше всего), антифунгальные, антипротозойные, противовирусные и цитотоксические (действующие на клетки животных и растений). В каждой из пяти групп антибиотики подразделяются на соединения широкого действия (действуют на большую часть представителей группы) и узкого действия (действуют на отдельных представителей). По механизму действия антибиотики классифицируются на ингибирующие синтез элементов клеточной стенки и ЦПМ; ингибирующие синтез белка и аминокислот; ингибирующие синтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот; блокирующие рецепцию и транспортные процессы в клетках.

Открытие антибиотиков связано с работами английских микробиологов А. Флеминга, Э. Чейна и Г. Флори. В 20-х годах прошлого века они наблюдали бактерицидное действие пенициллина, антибиотика, выделяемого грибом рода *Penicillium* при конкуренции его с бактериями. В 1940 году Г. Флори и Э. Чейн впервые выделили из культуральной жидкости *Penicillium notatum* пенициллин и исследовали его антимикробное действие. В настоящее время описано несколько тысяч антибиотиков, образуемых как прокариотами (в основном настоящими актиномицетами), так и эукариотами - грибами, простейшими, насекомыми.

**Техника определения чувствительности бактерий к антибиотикам.** Наиболее прост и доступен метод посева бактериальной культуры с нанесением дисков, пропитанных различными антибиотиками. Чтобы выполнить данное исследование, в стерильные чашки Петри разливают по 15 мл агаризованной питательной среды, например МПА. После застывания среды на поверхность делают посев 0,1 мл первичной (без разведения) суспензии культуры в дистиллированной воде методом распределения шпателем. Через 2-3 см на поверхность помещают с помощью стерильного пинцета диски 3<sup>4</sup> диска на чашку. Чашки инкубируют около 24 часов (в течение суток) в термостате при 28-30<sup>0</sup>С, затем измеряют размеры зон отсутствия роста.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Знакомство с техникой посева бактерий на определение чувствительности к антибиотикам. Осуществление посевов бактерий с диск-антибиотиками.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; х/б ткань для микроскопа и стекол; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги, дистиллированная вода для приготовления препаратов, раствор водного фуксина. Чашки Петри с МПА. Наборы с диск-антибиотиками.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, шпатели Дригальского, стерильные пипетки, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой, пробирки с стерильной дистиллированной водой для приготовления бактериальных суспензий.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Культуры бактерий, выделенных из почвы и воздуха на скошенном агаре или столбиках.

### **Задание 1. Микроскопический контроль чистоты культуры**

1. Приготовьте постоянные препараты своих бактериальных культур с окраской фуксином.
2. Промикроскопируйте при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.
3. Сделайте рисунки, отметьте все характерные особенности культур, убедитесь в чистоте выделенных культур.

### **Задание 2. Посев бактерий на МПА с диск-антибиотиками**

1. Приготовьте суспензию бактериальных клеток, взяв небольшое количество бактерий на петле в пробирку со стерильной дистиллированной водой.
2. Запишите в тетрадь названия антибиотиков, диски с которыми будете наносить на чашки Петри.
3. Сделайте посев суспензии культуры по 0,1 мл стерильной пипеткой и распределите ее по поверхности агара шпателем.
4. Через 2-3 минуты нанесите на чашки диски с антибиотиками стерильным пинцетом (рис. 19).
5. Поместите чашки на выращивание в термостат.
6. Уберите свое рабочее место и сдайте пробирки с культурами лаборанту.

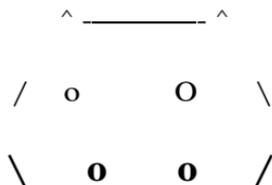


Рис. 19. Схема расположения диск-антибиотиков на чашке Петри

### Задание 3. Коллоквиум по пройденным темам. Физиология микроорганизмов

*Вопросы к коллоквиуму (полутестовые)*

Билет № 1

1. Метаболизм прокариотов имеет:  
А. Незначительные различия в начальных этапах, но значительные различия в конечных этапах;  
Б. Значительные различия в начальных и промежуточных этапах, но незначительные в конечных;  
В. Значительные отличия на начальных и конечных этапах и незначительные в промежуточном метаболизме.
2. Зависимый от бактериохлорофилла бескислородный фотосинтез осуществляют:  
А. *Natronobacter*; Б. *Chloroflexus*; В. *Heliobacterium*; Г. *Spirulina*.
3. К какому процессу относятся реакции:  
 $\text{CoA-SH} + \text{ПВК} \rightarrow \text{CoG} + \text{Ацетил-CoA}$ ;  
 $\text{Ацетил-CoA} + \text{Ацетил-CoA} \rightarrow \text{Диацетил} + 2 \text{CoA-SH}$ ;  
 $\text{Диацетил} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Ацетоин} + \text{НАД}^+$ .  
Каков смысл этих процессов? Кто их осуществляет? Как это применяется людьми?
4. Назовите различия ассимиляционной нитратредукции и денитрификации  
-5г Дайте характеристику плазмидам.

Билет № 2

1. *Streptococcus pneumonia* относятся по типу конструктивного метаболизма к:  
А. Автотрофам; Б. Копиотрофам; В. Факультативным паразитам; Г. Сапротрофам;  
Д. Паратрофам.
2. Нейтральные аминокислоты, глюкоза, галактоза транспортируются с помощью:  
А. Унипорта; Б. Симпорта; В. Антипорта; Г. Сидерофоров.
3. Все биосинтетические пути у бактерий находятся под контролем:  
А. Репрессии конечным продуктом; Б. Катаболитной репрессии; В. Катаболитной индукции.
4. На какие два типа делят у бактерий реакции субстратного фосфорилирования? Приведите примеры реакций.
5. Реакция:  
$$\text{CH}_3\text{-CO-COOH} + \text{HOOC-CH-CO-S-CoA} \rightarrow \text{HOOC-CO-CH}_2\text{-COOH} + \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO-S-CoA}$$
  
относится к:  
А. Гомоферментативному МКБ; Б. Спиртовому брожению; В. Пропионовокислому брожению; Г. Масляному брожению; Д. Пути Энтнера-Дудорова.
- 6 Приведите примеры модификационной изменчивости кластридий.

Билет № 3

1. К прототрофам относятся:  
А. Стафилококки; Б. Цианобактерии; В. Сульфатредукторы; Г. Энтерококки; Д. Сарцины.
2. Назовите принципы защиты процесса азотфиксации у цианобактерий. Почему это необходимо?

3. Какой тип брожения осуществляют кокки из родов *Streptococcus* и *Pediococcus*?
4. Некоторые клостридии могут накапливать в среде этиловый спирт, ацетон, изопропиловый спирт. Напишите реакции их образования.
5. Ассимиляционная сульфатредукция.

#### Билет № 4

1. Фотосинтез, зависящий от бактериоруберина, осуществляет:  
А. *Natronobacter*; Б. *Chloroflexus*; В. *Heliobacterium*; Г. *Spirulina*.
  2. Реакция: Ксилулозо-5-фосфат + НЗРО<sub>4</sub> → ацетил-фосфат + 3-ФГА относится к:  
А. Гомоферментативному МКБ; Б. Гетероферментативному МКБ; В. Циклу Кальвина;  
Г. Пути Энтнера-Дудорова. Назовите фермент, который катализирует эту реакцию.
  3. Какой метаболический путь объединяет *Sarcina ventriculi* и *Erwinia amylovora*?  
А. Гликолиз; Б. Цикл ТКК; В. Путь Энтнера-Дудорова; Г. Спиртовое брожение.
  4. Каковы отличия брожения от неполного окисления. Приведите примеры неполного окисления.
- \*\*\*<sup>St</sup> Дайте характеристику процессу трансформации.

#### Билет № 5

1. Чем отличаются прототрофы от ауксотрофов? Что является причиной превращения *E. coli* из прототрофа в ауксотрофа?
  2. Реакция: Н-СО-СООН + СН<sub>3</sub>-СО-S-КоА → Малат относится к:  
А. Гликолизу; Б. Циклу ТКК; В. Глиосилатному пути; Г. МКБ и служит для:  
А. Получения энергии; Б. Синтеза углеводов; В. Синтеза жирных кислот.
  3. Назовите группы клостридии по особенностям энергетического метаболизма.
  4. Пурпурные несерные бактерии из рода *Rhodospirillum* склонны к:  
А. Фотолитотрофии; Б. Хемолитотрофии; В. Фотоорганогетеротрофии; Г. Фотолитогетеротрофии.
- ~<sup>St</sup> Охарактеризуйте конъюгацию бактерий как пример рекомбинативной изменчивости.

#### Билет № 6

1. Хламидии и риккетсии относятся по типу конструктивного метаболизма к:  
А. Автотрофам; Б. Олиготрофам; В. Копитрофам; Г. Сапротрофам; Д. Прототрофам; Е. Паратрофам.
  2. Дайте определение процессам брожения. Назовите типы брожения у бактерий. В чем их принципиальное отличие друг от друга?
  3. Реакция:  
2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконовая кислота → ПВК + 3-ФГА относится к:  
А. Гликолизу; Б. Пути Энтнера-Дудорова; В. ПФП; Г. ЦТК. Какие бактерии осуществляют этот процесс? Каков его биохимический смысл?
  4. Для каких бактерий характерно «флавиновое дыхание»? В чем его сущность?
- ~<sup>St</sup> Приведите примеры антигенной изменчивости бактерий и докажете, что это необходимый элемент экологической адаптации микроорганизмов.

Билет ,№ 7

1. Выберите аминокислоты, предшественником которых является оксалоацетат:  
А. Триптофан; Б. Аспарат; В. Лизин; Г. Аланин; Д. Метионин; Е. Треонин;  
Ж. Серин; З. Изолейцин.
  2. Дайте определение процессам дыхания, подчеркните их отличие от брожений. Приведите примеры типов дыханий у бактерий. Чем они отличаются друг от друга?
  3. С помощью какого механизма транспортируется натрий:  
А. Унипорт; Б. Симпорт; В. Антипорт; Г. С сидерофорами.
- 4г Опишите работу лакоперона E. coli.
5. Какие компоненты входят в состав фотосистем? Укажите функции каждого из них.

Билет № 8

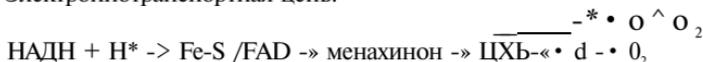
1. Какое соединение (не считая углекислого газа) встречается среди продуктов всех видов брожений? С какой реакцией это связано? Какова роль этой реакции?
  2. Назовите бактерий, осуществляющие гетероферментативное молочнокислое брожение. На какие две группы они делятся и почему?
  3. Диссимиляционная сульфатредукция.
  4. Восстановительный пентозофосфатный цикл Кальвина осуществляет:  
А. Natronobacter; Б. Chloroflexus; В. Heliobacterium; Г. Spirulina.
- 4. Главное отличие транспозонов от плазмид состоит в том, что они:  
А. Меньше по размеру; Б. Образуются реже; В. Не способны к автономной репликации.

Билет № 9

1. Напишите реакцию, отличающую энергетический катаболизм E. coli от Shigella sonnei. Какое это имеет значение для человека? Назовите тип брожения.
  2. Дайте характеристику процесса, отраженного на схеме:  
 $N=N + 2e + 2H^+ \rightarrow HN=NH + 2e + 2H^+ \rightarrow H_2N-NH_2 + 2e + 2H^+ \rightarrow 2NH_3$
  3. Какой тип дыхания осуществляют бактерии родов Methanobacterium, Methanosarcina, Methanoplasma? Дайте подробную характеристику этому типу дыхания.
- 4? Трансдукция как тип генетической рекомбинации бактерий.
5. Энергия трансмембранного потенциала используется для:  
А. Синтеза белков; Б. Транспорта Сахаров; В. Синтеза АТФ; Г. Движения.

Билет № 10

1. Приведите примеры механизмов аллостерической регуляции активности ферментов у бактерий.
- 7 Резкия\*  
 $HOOC-CH_2CH_2COOH + CH_3-CH_2CO-S-CoA \rightarrow HOOC-CH_2CH_2C(=O)S-CoA + CH_3CH_2COOH$   
относится к.....брожению. Закончите процесс брожения. Назовите род бактерий, осуществляющих этот вид брожения.
3. Электроннотранспортная цепь:



Фумаратредуктаза

Характерна для:.....

4. Восстановительный цикл Арнона характерен для:  
А. *Natronobacter*; Б. *Chloroflexus*; В. *Heliobacterium*; Г. *Spirulina*.
- А Что такое обогащающая и обедняющая мутация у бактерий?

Билет № 11

1. Лактобактерии по типу конструктивного метаболизма относятся к:  
А. Прототрофам; Б. Сапротрофам; В. Олиготрофам; Г. Копиотрофам; Д. Паратрофам
  2. Напишите возможные реакции превращения  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}\sim\text{S-CoA} \rightarrow$   
К какому типу брожения они относятся? Чем определяется путь превращения?
  3. К какой физиологической группе относятся клостридии видов: *tetani*, *perfringens*, *botulinum*? Почему?
  4. Для каких бактерий характерны пурпурные мембраны? Какой процесс здесь осуществляется?
- 5\*-Дайте определение патогенности и вирулентности. Каким видом изменчивости определяется патогенность? Вирулентность?

Билет № 12

1. В каких формах усваивают азот бактерии? Что служит источником азота для Кишечной палочки? Клостридии? Лактобактерии?
  2. Пировиноградная кислота служит предшественником:  
А. Гистидина; Б. Аланина; В. Триптофана; Г. Валина; Д. Глутамина.
  3. К какой физиологической группе относятся бактерии родов: *Ацетобактер*, *Ацетогенниум*, *Еубактериум*. Какой тип дыхания характерен для них?
- ~4\*-Охарактеризуйте модификационную изменчивость *E.coli*.
- ~&- Лиофилизация как метод хранения бактерий.

Билет № 13

1. Выберите вторичные продукты ж/д бактерий:  
А. Аминокислоты; Б. Ферменты; В. Антибиотики; Г. Этиловый спирт; Д. Молочная кислота.
  2. Фосфоенолпируват + эритрозо-4-фосфат - предшественники аминокислот:  
А. Аланина; Б. Лизина; В. Триптофана; Г. Тирозина; Д. Серина.
  3. Какова особенность использования тиоэфиров для синтеза АТФ у прокариотов? Напишите реакции возможных превращений ацетилфосфата.
  4. Что собой представляет разорванный ЦТК? Для каких бактерий он характерен? Какую роль осуществляет?
- т§«Микробиологическое получение витаминов.

Анализ антибиотической устойчивости выделенных культур

По спектру действия антибиотики делят на 5 групп, причем каждая включает две подгруппы: антибиотики широкого и узкого спектра действия.

1. Антибактериальные антибиотики. Самая многочисленная группа. Преобладают антибиотики широкого спектра действия: *аминогликозиды*, *бета-лактамы*, *тетрациклины*. В настоящее время стали появляться антибиотики более узкого спектра действия: *полимиксины* для грам(-) бактерий и *ванкомицин* для грам(+).

2. Противогрибковые. В настоящее время в качестве антифунгальных препаратов используют производные азолов, пептидные и белковые антибиотики. Поиск эффективных антифунгальных препаратов продолжается. Широкого спектра действия — *амфотерицин В*, узкого — *нистатин* — против кандид.

3. Антипротозойные. В настоящее время найдено не очень большое количество. Примеры широкого спектра действия: *фуразолидон*, *фурацилин*, *метронидазол*.

4. Антивирусные. Широкого спектра действия: *ремантадин*, *арбидол*. Узкого действия: *ацикловир* (герпес-вирусы).

5. Противоопухолевые. Оказывают цитотоксическое действие: *митомоцилин С*.

Действие антибиотиков может быть убивающим - *цидным* или снижающим рост - *статическим*.

Механизм действия антибиотиков. По механизму действия антибиотики можно также подразделить на 5 подгрупп.

1. Антибиотики, нарушающие синтез пептидогликанов клеточной стенки бактерий - р-лактамы. Эта группа наименее токсична для макроорганизма, к этой группе относятся пенициллин и его многочисленные аналоги. Современные р-лактамы - группа цефалоспоринов: цефазолин, цефоперазон и др. Они действуют на широкий спектр бактерий.

2. Антибиотики, нарушающие синтез белков. Многочисленная группа с широким спектром действия: аминогликозиды, тетрациклины, стрептомицин.

3. Антибиотики, нарушающие целостность ЦПМ, синтез компонентов ЩТМ. Антибиотики широкого спектра действия: полимиксины, полиены. Ванкомицин - активен в основном против грам(+) бактерий. Ванкомицин изменяет проницаемость мембраны, синтез РНК.

4. Антибиотики, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот. Хинолоны - ингибиторы синтеза ДНК. Рифомпицин (синтез РНК).

5. Антибиотики, подавляющие синтез пуринов и аминокислот. Сюда относятся сульфаниламиды, антибиотики широкого спектра действия, небезопасны для макроорганизма.

Бактерии постоянно и достаточно быстро эволюционируют, приобретая новые признаки, в том числе и устойчивость к действию антибиотиков. Формирование устойчивости определяется многими факторами. Это может быть обусловлено генной мутацией, которая приведет к изменению субстрата, на который действует антибиотик. Например, стрептомицин нарушает синтез белка в бактериальной клетке, взаимодействуя с одним из белков 30S субъединицы рибосом. Мутация в гене, кодирующем этот белок, может нарушать его способность связываться с стрептомицином, не влияя на работу рибосом. Поэтому клетки с этой мутацией становятся устойчивыми к стрептомицину.

В дальнейшем была обнаружена плазида, ответственная за формирование резистентности бактерий к действию неблагоприятных факторов - *R-плазида*. Данная плазида имеет гены, кодирующие ферменты, метаболизирующие конкретные антибиотики. Множественная устойчивость бактерий (к целому ряду антибиотиков) обычно обусловлена наличием у них Я-плазмиды. Распространение среди бактерий этой плазмиды ведет к повышению устойчивости бактерий к антибиотикам, применяемым в виде лекарственных средств, и вынуждает продолжать поиски все новых и новых препаратов для борьбы с бактериальными инфекциями.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ антибиотической чувствительности выделенных штаммов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Линейки для измерения зон задержки роста.

**ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ.** Чашки Петри с посевами с диск-антибиотиками.

**Техника определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.** Проводят измерение зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками. При зоне до 10 мм штамм расценивается как устойчивый, 11-15 мм - как малоустойчивый, 15-25 мм - как чувствительный. Зоны, превышающие 25 мм, свидетельствуют о высокой чувствительности к данному антибиотику.

Задание. 1. Измерьте зоны задержки роста выделенного штамма вокруг дисков с различными антибиотиками.

2. Внесите данные в тетрадь. Охарактеризуйте чувствительность выделенных штаммов к данным антибиотикам.

3. Составьте отчет о свойствах выделенных штаммов по следующей схеме.

## Характеристика свойств выделенного штамма

- 1) Морфологические признаки: форма клеток и характер образуемых скоплений, наличие или отсутствие подвижности.
  - 2) Окраска по Граму.
  - 3) Наличие и характер внутриклеточных включений.
  - 4) Наличие или отсутствие эндоспорообразования.
  - 5) Отношение к кислороду и тип катаболизма.
  - 6) Использование углеводов.
  - 7) Наличие или отсутствие разжижения желатина.
  - 8) Наличие амилалитической активности.
  - 9) Чувствительность к антибиотикам.
  - 10) Культуральные признаки.
4. Сделайте предположение о родовой и (если возможно) видовой принадлежности выделенных штаммов бактерий.
5. Отчитайтесь о проделанной работе преподавателю.

### Часть III. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ. ЭВОЛЮЦИЯ ПРОКАРИОТ

#### Тема 4. Изучение отдельных групп бактерий

Бактерии способны осуществлять 8 типов жизни, четыре при использовании в качестве источника энергии связей химических соединений (хемотрофы) и еще четыре при использовании энергии света (фототрофы).

**Хемотрофы.** Подразделяют на *хемоорганогетеротрофов* — источник углерода - органические соединения; донор электронов - органические соединения. К этой группе относится большинство бактерий (почвенные бактерии, энтеробактерии), а также все животные и грибы.

*Хемолитогетеротрофы.* Источник углерода - органические соединения; донор электронов - неорганические соединения. Часть железо-, водородных бактерий, часть сульфатредукторов.

*Хемоорганоавтотрофы.* Источник углерода - углекислый газ; источник электронов - органические соединения. Сюда относят факультативных метилотрофов, окисляющих муравьиновую кислоту.

*Хемолитоавтотрофы.* Источник углерода — углекислый газ; источник электронов — неорганические соединения. Большинство водородных, небольшое количество железобактерий, нитрифицирующие и нитрофицирующие бактерии, часть серных и сульфатредуцирующих бактерий.

**Фототрофы.** Также подразделяют на четыре подгруппы.

*Фотолитоавтотрофы.* Источник углерода - углекислый газ; источник электронов - неорганические соединения. Цианобактерии, прохлорофиты, часть пурпурных и зеленых бактерий.

*Фотоорганоавтотрофы.* Источник углерода — углекислый газ; источник электронов - органические соединения. Часть пурпурных бактерий.

*Фотолитогетеротрофы.* Источник углерода - органические соединения; источник электронов - неорганические соединения. Часть пурпурных и зеленых бактерий.

*Фотоорганогетеротрофы.* Источник углерода - органические соединения; источник электронов - органические соединения. Часть пурпурных бактерий, галобактерии.

#### Занятие № 20

#### Микроскопическое изучение молочнокислых бактерий

Бактерии, осуществляющие молочнокислое брожение, относятся к одной из наиболее примитивных групп эубактерий. Они характеризуются большой потребностью в органических соединениях, поэтому растут только на богатых органикой средах. Конструктивный метаболизм развит пло-

хо, поэтому молочнокислые бактерии нуждаются в витаминных соединениях. Важнейшими признаками молочнокислых бактерий являются: грамположительность, осуществление гомо- или гетероферментативного молочнокислого брожения, отсутствие процессов дыхания, аэротолерантная анаэробность, требовательность к среде культивирования, отсутствие спор, отсутствие фермента каталазы.

Для микроскопирования и наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока (простокваша). Можно приготовить также фиксированные препараты из кисломолочных продуктов (йогурта, кефира, ацидофилина, ряженки, бифидока и др.).

Если простоквашу хранить при комнатной температуре, то на ее поверхности появляется белая или кремовая бархатистая морщинистая пленка. Такая же пленка обычно образуется на поверхности рассола при квашении огурцов, капусты и других овощей. Это молочная плесень - *Geotrichum candidum*.

Бактериологическую петлю вводят в стусток и, повернув вокруг оси, извлекают. Стусток наносят на предметное стекло очень тонким слоем без воды. Просушивают на воздухе и фиксируют спирт-эфирной смесью (1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и с помощью эфира извлекается и удаляется жир, капли которого на препарате мешают окраске и микроскопированию.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим в течение 2-3 минут, промывают водой, высушивают и микроскопируют в иммерсионной системе. Метиленовый синий является лучшим красителем для молочнокислых бактерий, так как он слабо окрашивает фон (казеин) и хорошо - клетки бактерий.

На препарате обычно преобладают мелкие шаровидные клетки, собранные в короткие цепочки - *Lactococcus lactis*, иногда также видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus bulgaricus*. На плотных средах эта бактерия образует мелкие характерные колонии в виде комочков ваты, выпуклые, непрозрачные, непигментированные. Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживаются также и клетки молочной плесени - *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*). Прямоугольные или овальные клетки плесени отличаются большими размерами по сравнению с бактериями (рис. 20).

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Познакомиться с микробиотой молочнокислых продуктов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; раствор метиленового синего 1 : 40; раствор эритрозина; х/б ткань для микроскопа и стекло; набор для приготовления постоянных препаратов: предметные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Кисломолочные продукты: йогурты, простокваша, сыры.

А

Б

Рис. 20. А - лактобактерии; Б - Молочная плесень

*Препарат из квашеной капусты:* сначала втирают в предметное стекло кусочки капусты, подсушивают и фиксируют препарат над пламенем горелки. Остывший препарат окрашивают эритрозином (этот краситель, в отличие от фуксина, не окрашивают растительные элементы). В квашеной капусте преобладают тонкие, хорошо прокрашиваемые палочки *Lactobacillus plantarum*.

Задание 1. Подготовка препаратов

1. Приготовьте фиксированный препарат йогурта или простокваши.
2. Окрасьте препараты метиленовым синим.
3. Приготовьте препарат из квашеной капусты.
4. Окрасьте эритрозином.

Задание 2. Микроскопирование препаратов

1. Промикроскопируйте препараты с иммерсионной системой.
2. Сделайте рисунки препаратов, обозначьте характерные особенности обнаруживаемых микроорганизмов.
3. Уберите свое рабочее место, сдайте лабораторную работу преподавателю.

## Микроскопирование маслянокислых бактерий

Маслянокислые бактерии обитают в почве. Это в основном представители рода *Clostridium*. По преобладанию определенных конечных продуктов различают истинно маслянокислое брожение (субстратами служат глюкоза, крахмал) — продукт в основном масляная кислота; ацетонобутиловое брожение - продукты масляная и уксусные кислоты, ацетон, бутиловый спирт; брожение пектиновых соединений — продукты различные карбоновые кислоты и спирты. Маслянокислые бактерии являются строгими анаэробами, распространены в почвах, в растительных остатках, навозе, молоке. В качестве источников азота маслянокислые бактерии используют различные азотистые соединения: пептон, аминокислоты, аммиачные соли. Некоторые способны к фиксации атмосферного азота. Характерная особенность маслянокислых бактерий - накопление гранулы перед эндоспорообразованием.

Маслянокислое брожение крахмала можно наблюдать на среде с картофелем. Сырой неочищенный картофель нарезают мелкими кубиками, заполняют ими 1/3 высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водопроводной водой на 2/3 пробирки, закрывают ватно-марлевыми пробками и помещают на водяную баню при 80°C на 10 минут для пастеризации. Споры маслянокислых бактерий обычно имеются в коже картофеля.

Элективные условия для развития маслянокислых бактерий создаются благодаря пастеризации (гибнут все вегетативные клетки неспорообразующихся бактерий), крахмал - используется только бактериями, синтезирующими амилазу, высокий столбик среды способствует анаэробности условий культивирования, образующиеся СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub> вытесняют воздух, содержащий кислород.

Через 2-3 дня картофель всплывает вследствие бурного газообразования. Культуральную жидкость после окончания брожения используют для исследования морфологии маслянокислых бактерий и качественного определения продуктов брожения.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Познакомиться с морфологией и особенностями физиологии маслянокислых бактерий.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Спирт-эфирная смесь для протирки объектива; иммерсионное масло; раствор Люголя; раствор 5 %-ного хлорного железа; х/б ткань для микроскопа и стеклов; набор для приготовления

препаратов: предметные и покровные стекла, кусочек сухого мыла, полоски фильтровальной бумаги.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Накопительные культуры маслянокислых бактерий.

### **Задание 1. Микроскопирование маслянокислых бактерий**

1. Подготовьте предметное стекло и поместите его на мостик кристаллизатора.
2. Наберите небольшое количество культуральной жидкости в пипетку и нанесите каплю на предметное стекло.
3. К капле накопительной культуры добавьте каплю раствора Люголя.
4. Накройте покровным стеклом и микроскопируйте с иммерсионной системой.
5. Отметьте наличие сине-фиолетовых гранул гранулезы в клетках.
6. Сделайте рисунок накопительной культуры маслянокислых бактерий.

В культуральной жидкости можно провести определение продуктов брожения, прежде всего масляной кислоты. Реакция основана на образовании маслянокислого железа при добавлении хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ). При нагревании растворы маслянокислого железа приобретают коричневую окраску. Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буровато-коричневый цвет, а в проходящем свете - кроваво-красный.

### **Задание 2. Проведение качественной реакции на масляную кислоту**

1. В пробирку налейте 1-2 мл культуральной жидкости.
2. Добавьте 0,5-1 мл 5 %-ного раствора хлорного железа
3. Занесите в тетрадь полученные результаты.

## *Занятие № 22*

### **Брожение и кислородное окисление целлюлозы**

Целлюлозу расщепляют анаэробные спорообразующие бактерии, обитающие в почве, навозе, на растительных остатках, в рубце жвачных животных.

Первый этап Представляет собой гидролиз целлюлозы ферментом *целлюлозой*. Продуктом гидролиза является дисахарид *целлобиоза*. Целлобиоза гидролизуется ферментом *целлобиазой* до двух остатков глюкозы.

На втором этапе глюкоза сбраживается до уксусной, муравьиной, молочной кислот и этилового спирта, углекислого газа и водорода.

Процесс окисления целлюлозы в аэробных условиях широко распространен. В рыхлой, хорошо аэрированной почве целлюлозу окисляют

аэробные бактерии, актиномицеты и грибы. В данном случае глюкоза, образующаяся при гидролизе целлобиозы, окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , промежуточными метаболитами служат оксикислоты.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Получение накопительных культур анаэробных и аэробных микроорганизмов, разрушающих целлюлозу.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Плоскодонные колбы на 50 мл с корковыми пробками, имеющими отверстия для выхода газов (со стеклянными трубочками в центре).

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Небольшое количество почвы (желательно свежей), полоски фильтровальной бумаги. Среда для культивирования анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий. Гелевые пластинки для культивирования аэробных целлюлозоразрушающих бактерий.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Культуры анаэробных и аэробных разрушителей целлюлозы.

**Задание 1.** Получение накопительной культуры мезофильных анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий

В круглую плоскодонную колбу внести около 1-2 г фильтровальной бумаги, нарезанной узкими полосами, или ваты, и залить доверху средой следующего состава (%):  $\text{KNH}_4\text{HPO}_4$  - 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,03; пептон - 0,1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,05;  $\text{CaCO}_3$  - 0,5 (готовится лаборантом). Среду заразить небольшим количеством почвы, закрыть корковой пробкой с отверстием для выхода газов и поставить в термостат при  $30^\circ\text{C}$ .

Элективные условия для развития целлюлозоразлагающих бактерий определяются присутствием целлюлозы и анаэробностью, пептон стимулирует процесс брожения. Через 7-10 суток начинается брожение целлюлозы, которое может длиться 2-3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизнется, желтеет и постепенно разрушается.

**Задание 2.** Получение накопительной культуры аэробных бактерий, окисляющих целлюлозу

*Способ 1.* Для получения данных накопительных культур используют метод Виноградского на гелевых пластинах. Поверхность геля покрывают стерильным кружком фильтровальной бумаги, по которому раскладывают (по трафарету) 50 комочков почвы (диаметром 1-2 мм) или наносят суспензию почвы. Чашки помещают во влажную камеру вверх дном и инкубируют при  $28-30^\circ\text{C}$  8-10 суток. Вокруг комочков почвы появляются розовые, зеленые, желтые, буровато-желтые колонии бактерий.

*Способ 2.* Можно также использовать среду Гетгинсона. Среду разлить в чашки Петри и на поверхность наложить фильтровальную бумагу, вырезанную по размеру чашки и предварительно простерилизованную. Стеклопалочкой с оттянутым концом на поверхность

фильтра раскладывают параллельными рядами комочки почвы на расстоянии 1 см. Засеянные чашки Петри помещают в эксикатор над водой и ставят в термостат 30°C. Через 10-14 суток вокруг комочков развиваются колонии целлюлозоразлагающих микроорганизмов в виде желтых, зеленых, оранжевых и коричневых пятен. В местах образования колоний фильтровальная бумага разлагается.

Задание 3. Запишите в тетради условия выращивания накопительных культур анаэробных и аэробных целлюлозоразрушающих бактерий.

### Занятие № 23

Анализ роста накопительных культур целлюлозоразрушающих бактерий. Определение целлюлазной активности

Через 7 суток роста начинается брожение целлюлозы анаэробными бактериями в основном по типу маслянокислого брожения. Этот процесс осуществляют бактерии из рода *Clostridium*. Процесс брожения сопровождается выделением большого количества органических кислот: уксусной, янтарной, молочной, масляной, муравьиной; и спиртов: этилового, бутилового, изопропилового, а также углекислого газа и водорода.

Мезофильные анаэробные разрушители целлюлозы *Clostridium ome-lanskii*-длинные, тонкие палочки с круглой спорой на конце клетки (рис. 21).

В культуральной жидкости можно определить целлюлазную активность. Метод определения активности основан на определении восстанавливающих Сахаров, образующихся при действии целлюлозолитических ферментов на целлюлозу. За единицу активности принимают количество фермента, катализирующего образование 1 мг восстанавливающих Сахаров в течение 1 минуты при температуре 50°C.



Рис. 21. *Clostridium ome-lanskii*;  
а) молодые клетки; б) клетки со спорами

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительных культур целлюлозоразрушающих бактерий. Микроскопирование анаэробных мезофильных целлюлозоразрушающих бактерий. Определение целлюлазной активности.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой. Пробирки, кипящая водяная баня. Фотоэлектроколориметр КФК-2 или КФК-3, кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Колбы с брожением целлюлозы. Предметные стекла, раствор водного фуксина. 0,8 %-ный раствор микрокристаллической целлюлозы (КМЦ), 0,06 %-ный раствор ферроцианида калия, стандартный раствор глюкозы 0,15 мг/мл.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Культуры анаэробных разрушителей целлюлозы, целлюлазная активность культуральной жидкости.

**Задание 1.** Микроскопирование накопительной культуры мезофильных целлюлозоразрушающих бактерий

1. Приготовьте предметное стекло для подготовки препарата.
2. Достаньте пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги.
3. Размажьте его по предметному стеклу без добавления воды.
4. Высушите мазок и зафиксируйте в пламени горелки.
5. Окрасьте мазок фуксином.
6. Промикроскопируйте 15х90 в иммерсионной системе.
7. Зарисуйте и отметьте характерные особенности представителей данной накопительной культуры.

**Задание 2.** Определение целлюлазной активности

1. Построение калибровочной кривой.

Из раствора глюкозы с исходной концентрацией 0,15 мг/мл подготовьте серию разведений (табл. 2).

*Таблица 2*

Подготовка разведений стандартного раствора глюкозы

Количество исходного раствора (мл)	Количество воды (мл)	Содержание глюкозы в полученных стандартных растворах (мкг/мл)
<b>ОД</b>	0,9	15
0,3	0,7	45
0,5	0,5	75
0,7	0,3	105
0,9	0,1	135
1,0	0,0	150

В пробирки с 1 мл каждого их разведений добавьте по 3 мл 0,06 %-ного раствора ферроцианида калия и поместите на кипящую водяную баню на 10 минут. Пробирки охладите и измерьте ОП при длине волны 410 нм против дистиллированной воды, толщина кюветы 10 мм. Постройте по полученным данным калибровочную кривую зависимости ОП от концентрации глюкозы.

2. Отделите культуральную жидкость накопительной культуры целлюлозоразрушающих бактерий от клеток фильтрованием через бумажный фильтр.

3. Ход определения целлюлазной активности.

*Опытная проба.* В пробирку внесите 5 мл 0,8 %-ного раствора микрористаллической целлюлозы, прогрейте 10 минут при 50 С и добавьте 1 мл культуральной жидкости. Поместите в водяную баню при 50°C на 20 минут для протекания ферментативной реакции. Затем один мл гидролизата перенесите в другую пробирку и добавьте 3 мл 0,06 %-ного раствора ферроцианида, пробирку поместите в кипящую водяную баню на 10 минут. Пробирку охладите и измерьте ОП в тех же условиях, что и при построении калибровочной кривой. Контрольная проба: 5 мл раствора КМЦ + 1 мл культуральной жидкости, предварительно прокипяченной в течение 15 минут для инактивации целлюлозолитической активности. Проводится через те же этапы, что и опытная.

4. Расчет целлюлазной активности. По калибровочной кривой определите количество глюкозы, соответствующее значению разницы ОП опытной и контрольной проб. Целлюлазную активность рассчитывают по формуле:

$$C, \text{ мг/мин} = A / B \times T \times 1000,$$

где А - количество глюкозы (мкг/мл), найденное по калибровочной кривой; В - количество культуральной жидкости (мл), Т - время гидролиза (мин), 1000 - пересчет глюкозы из мкг в мг.

### Занятие № 24

#### Анализ роста аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов

В отличие от процесса анаэробного разрушения целлюлозы, который осуществляют только бактерии, в аэробных условиях этот процесс происходит под действием многих микроорганизмов различных систематических групп: миксобактерий, актиномицетов и грибов.

В кислых лесных почвах главными целлюлозоразрушителями можно считать грибы из родов: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* и базидиальные грибы. Под травянистой растительностью степных и луговых ландшафтов, кроме грибов, разрушителями целлюлозы являются миксобактерии, актиномицеты и вибрионы рода *Cellvibrio*. В аэробных условиях глю-

коза, образующаяся после гидролиза целлюлозы и целлобиозы, окисляется сначала до оксикислот, а затем до углекислого газа и воды.

Через 10-14 суток культивирования вокруг комочков почвы развиваются аэробные целлюлозоразлагающие микроорганизмы. Они формируют желтые, зеленые, оранжевые и коричневые колонии. В местах образования колоний фильтровальная бумага разлагается, ослизняется, становится прозрачной. По морфологии можно сразу дифференцировать колонии (пропагулы) плесневых грибов.

Из миксобактерий можно обнаружить представителей родов *Cytophaga*, *Pofyangium*, *Sorangium*.

***Cytophaga*** - слегка изогнутые, длинные палочки (3-8 мкм) с заостренными концами. По мере старения палочки укорачиваются, концы округляются и переходят в кокковидные миксоспоры (миксоцисты), соединенные слизью. Разные виды этого рода образуют на клетчатке желтые, розовые, пурпурные или красно-коричневые, иногда бесцветные колонии.

***Cellvibrio*** — мелкие, слегка изогнутые в виде полумесяца неспорообразующие палочки с закругленными концами. Длина 1,3-2 мкм. Образуют колонии желто-оранжевого цвета.

***Cellfalcicuta*** — палочки, утолщенные в центре и заостренные на концах. На целлюлозе образуют слизистые зеленые колонии. Пигмент диффундирует в среду, окрашивая гель в зеленый цвет.

***Poliangium*** и ***Sorangium*** - миксобактерий, как и ***Cytophaga***. Представляют собой цилиндрические палочки с тупыми, закругленными концами, при старении укорачиваются и образуют миксоспоры, собранные по 12-40 в спорангиоли - составные части плодовых тел. На целлюлозе образуют слизистый налет желтого, оранжевого или темно-коричневого цвета (рис. 22).

Из актиномицетов участие в разложении целлюлозы принимают ***Actinomyces violaceus***, ***A. cellulosa*** и ***Micromonospora chalcone***.

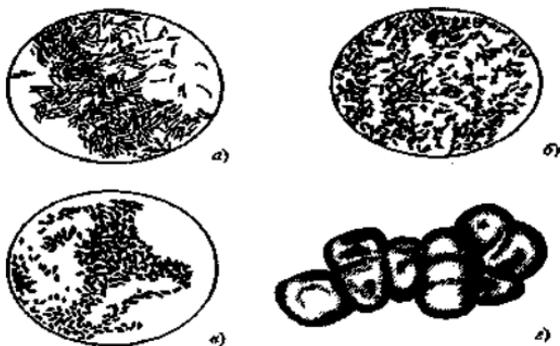


Рис. 22. Аэробные бактерии, окисляющие целлюлозу: а - *Cytophaga*; б - *Cellvibrio*; в - *Cellfalcicuta*; г - *Pofyangium*, плодовые тела

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительных культур аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Микроскопирование аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Чашки Петри с накопительными культурами аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Предметные стекла и покровные стекла.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Культуры аэробных разрушителей целлюлозы.

### **Задание 1. Анализ роста накопительной культуры аэробных целлюлозоразрушающих бактерий**

1. Проведите анализ роста накопительной культуры аэробных целлюлозоразрушающих бактерий.

2. Отметьте в тетради, появились ли признаки разложения фильтровальной бумаги вокруг комочков почвы.

### **Задание 2. Микроскопирование целлюлозоразлагающих грибов**

1. Подготовьте несколько предметных и покровных стекол для приготовления препаратов «раздавленная капля».

2. Приготовьте препарат «раздавленная капля» для микроскопирования спорангий грибов, разрушителей целлюлозы, микроскопируйте с увеличением 15х40.

3. Сделайте рисунки препаратов с соответствующими обозначениями.

### **Задание 2. Микроскопирование аэробных целлюлозоразрушающих бактерий**

1. Подготовьте предметные стекла для постоянных препаратов.

2. Подготовьте постоянные препараты с бактериальных колоний, окрасьте фуксином, микроскопируйте при увеличении 15х90 в иммерсионной системе.

3. Сделайте рисунки препаратов с соответствующими обозначениями.

## *Занятие № 25*

### **Посев накопительной культуры денитрификаторов**

Денитрификация - процесс нитратного дыхания, сопровождающийся образованием газообразных форм азота, что ведет к обеднению почвы соединениями азота, являющихся доступными для растений. Процессы денитрификации протекают в анаэробных условиях, конечные продукты

выделяются из клеток в виде  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  в зависимости от вида микроорганизма и условий среды.

Число денитрификаторов достаточно высоко, они обитают во влажных слабоаэрируемых почвах с высоким содержанием органических соединений. Процесс нитратного дыхания способны осуществлять представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas* - хемоорганогетеротрофы; *Thiobacillus denitrificans* - хемолитотрофы. Для получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий используют синтетическую среду Гильтая.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Посев культур денитрифицирующих бактерий в накопительную культуру.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Пробирки со стерильной средой Гильтая. Комочки почвы.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Стерильное вазелиновое масло.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Почвенные денитрификаторы.

### **Задание 1. Посев накопительной культуры почвенных денитрификаторов**

1. В пробирки со средой Гильтая поместить по комочку почвы, плотно закрыть пробками.

2. Для создания анаэробных условий поверхность в пробирках покрыть тонким слоем вазелинового масла.

3. Поместить пробирки в термостат при  $30\text{-}35^\circ\text{C}$  на 7-10 суток.

4. Запишите в тетради условия выращивания накопительной культуры денитрификаторов.

Задание 2. Коллоквиум по происхождению и эволюции биохимических процессов микроорганизмов

#### *Вопросы к коллоквиуму*

1. Этапы химической эволюции на планете Земля.
2. Возникновение низкомолекулярных органических соединений. Формирование оптической активности мономерных соединений.
3. Полимеризация мономеров, роль оптических изомеров.
4. Возникновение сложных химических систем, появление каталитических процессов.
5. Возникновение и эволюция процессов матричного синтеза. Гипотеза формирования функциональных блоков Уголева.
6. Формирование протоклетки. Гипотезы Фокса и Опарина.
7. Эволюция биохимических процессов. Брожения. Проблема акцептора электрона.
8. Появление процессов фотосинтеза и их эволюция.
9. Формирование систем антиоксидантной защиты у бактерий.

10. Появление дыхания. Флавиновое дыхание пропионовых бактерий.
11. Эволюция электронно-транспортных цепей.
12. Формирование некислородных типов дыхания.
13. Эволюция генетического аппарата бактерий.

### Занятие № 26

#### Анализ накопительной культуры почвенных денитрификаторов

Через 7-10 суток в случае развития почвенных денитрификаторов наблюдается помутнение среды Гильтая, образование пены на поверхности за счет выделения углекислого газа и газообразных соединений азота. Нередко при развитии бактерий вида *Pseudomonas aerogenosa* наблюдается позеленение культуральной жидкости за счет выделения сине-зеленого пигмента клетками данного вида псевдомонад.

Ход процесса денитрификации можно контролировать также по исчезновению нитритов и нитратов из среды культивирования. Для этого необходимо провести качественную реакцию с дефиниламиновым реактивом, реактивом «цинк-йод-крахмал» и с реактивом Несслера.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительной культуры денитрифицирующих бактерий.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Пробирки со средой Гильтая, зараженной комочками почвы. Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Дифениламин, кристаллический; серная кислота, конц.; реактив Несслера; реактив цинк-йод-крахмал или реактив Грисса; 20%-ная серная кислота; водный фуксин.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Накопительная культура почвенных денитрификаторов.

Задание 1. Анализ роста накопительной культуры почвенных денитрификаторов

1. Отметить в тетрадях помутнение, образование пены на поверхности среды.

2. Приготовить фиксированный препарат, достав бактериологической петлей со дна пробирки часть культуры. Окрасить водным фуксином.

3. Промикроскопировать препарат при увеличении 15х90 в иммерсионной системе. Сделать рисунок препарата в тетради.

## **Задание 2. Проведение качественных реакций на продукты процесса денитрификации**

1. Провести реакцию на обнаружение азотистой кислоты. Для этого в фарфоровую чашку к 3-м каплям реактива цинк-йод-крахмала или реактива Грисса добавить 1 каплю 20 %-ной  $H_2SO_4$  и 1 каплю исследуемой жидкости. В присутствии азотистой кислоты жидкость окрашивается в темно-синий цвет или в розовый (реактив Грисса).

2. Провести качественное определение азотной кислоты в культуральной жидкости. В фарфоровую чашку к 3-4 каплям конц. серной кислоты добавить кристаллик дифениламина и после его растворения 1 каплю исследуемой культуральной жидкости. В присутствии азотной кислоты жидкость окрашивается в темно-синий цвет.

3. Для определения накопления аммиака в среде культивирования на фарфоровую пластинку к нескольким каплям среды добавить каплю реактива Нesslerа. В присутствии следов аммиака жидкость окрашивается в желтый цвет, при большой концентрации аммиака образуется коричневый осадок.

### *Занятие № 27*

#### **Получение накопительной культуры аммонификаторов**

Аммонификация - процесс разложения азотсодержащих соединений - белков, пептидов, аминокислот, нуклеиновых кислот, мочевины, хитина, гумусовых веществ, - сопровождаемый выделением аммиака. Осуществляется многими бактериями и грибами.

Для выявления анаэробных аммонификаторов получают их накопительную культуру на мясном бульоне с добавлением 2 %-ного пептона. Среду заливают в пробирки, заполняя 2/3 пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют.

Среду заражают комочком почвы. Для выделяющегося аммиака под пробку подвешивают полоску лакмусовой бумаги, для обнаружения сероводорода - полоску фильтровальной бумаги, смоченную 10 %-ным раствором уксуснокислого свинца. Для герметичности пробирку плотно закрывают целлофановым колпачком.

Пробирки инкубируют при 25-28°C. Через 3-5 суток проводят анализ наличия в среде аммонификаторов. Выделение аммиака выявляется по посинению лакмусовой бумаги, выделение сероводорода - по почернению бумаги, смоченной уксуснокислым свинцом.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Получение накопительной культуры анаэробных аммонификаторов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Пробирки со средой, горелки. Термостат для культивирования.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Полоски лакмусовой бумаги и фильтровальной бумаги, пропитанной 10 %-ным раствором уксуснокислого свинца. Комочки почвы.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Почвенные аммонификаторы.

Задание 1. Посев в накопительную культуру анаэробных аммонификаторов

1. Внесите в пробирку со средой комочек почвы, работая в стерильной зоне горелки.

2. Поместите с помощью пинцета в пробирку лакмусовую бумагу и бумагу, пропитанную раствором уксуснокислого свинца, закрепив концы пробкой.

3. Прикройте ватные пробки целлофановыми колпачками для большей герметичности.

Задание 2. Выращивание накопительной культуры аммонификаторов

1. Поместите пробирки в термостат на выращивание.

2. Запишите в тетради условия выращивания накопительной культуры почвенных аммонификаторов.

### *Занятие № 28*

Анализ накопительной культуры почвенных аммонификаторов.  
Определение их протеолитической активности

Микроорганизмы-аммонификаторы выделяют в среду культивирования протеолитические ферменты. Активность внеклеточных протеаз можно определить, используя в качестве субстратов различные белки: казеин, желатин, альбумины. Выявить протеолитическую активность можно, сделав посев на плотную среду или более быстро - в жидкой культуре.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительной культуры аммонифицирующих анаэробных бактерий. Определение протеолитической активности аммонификаторов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Пробирки с накопительной культурой аммонификаторов. Микроскоп С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой. Центрифуга.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Водный фуксин; 5 %-ный раствор желатина с pH 7,3-7,5; 96 %-ный этиловый спирт; 1 %-ный раствор фенолфталеина; 0,1 Н раствор NaOH. Фильтровальная бумага или центрифужные пробирки и воронки, микробюретки или пипетки для титрования с

ценой деления 0,02 мл. Конические колбы на 50-100 мл для проведения титрования. Иммерсионное масло.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Накопительная культура почвенных аммонификаторов.

Задание 1. Анализ накопительной культуры аммонификаторов

1. Опишите в тетрадах качественные реакции на присутствие продуктов аммонификации: аммиака и сероводорода.

2. Приготовьте постоянный препарат из нижних слоев культуральной жидкости. Окрасьте водным фуксином.

3. Промикроскопируйте препарат при увеличении 15x90 в иммерсионной системе.

4. Сделайте рисунок и отметьте особенности морфологии микроорганизмов-аммонификаторов.

Задание 2. Определение протеолитической активности экзоферментов аммонификаторов

1. Отделите культуральную жидкость от клеток методом фильтрования или центрифугирования в закрытых пробирках.

2. К 10 мл 5 %-ного раствора желатина, нагретого до 40°C, прилейте 2 мл культуральной жидкости. Сразу отберите 1 мл в коническую колбу с предварительно внесенными 20 мл 96 %-ного этанола и 0,2 мл 1 %-ного раствора фенолфталеина (контрольная проба).

3. Оставшуюся смесь желатина с культуральной жидкостью поместите в термостат с температурой 40°C на 3 часа для гидролиза.

4. Контрольную пробу протитруйте 0,1 Н раствором NaOH. После появления розового окрашивания прибавьте еще 4 капли щелочи и закончите титрование.

5. Через 3 часа отберите 1 мл реакционной смеси в коническую колбу с 20 мл 96 %-ного этанола и 0,2 мл 1 %-ного раствора фенолфталеина (опытная проба) и титруйте так же, как контрольную.

6. Проведите расчет протеолитической активности экзоферментов аммонификаторов по формуле:

$$ПА = (a - a_k) \times 1,4K / t \times P,$$

где  $a$  - количество 0,1 Н NaOH, пошедшего на титрование 1 мл опытной пробы;  $a_k$  - то же для контрольной пробы; 1,4 - коэффициент пересчета количества 0,1 Н раствора щелочи в миллиграммы азота аминокислот и полипептидов;  $K$  - поправка к титру щелочи (1,06);  $t$  - время протеолиза, ч;  $P$  - коэффициент, учитывающий разведение (21,2).

## Занятие № 29

### Обнаружение свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов. Получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий

Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы встречаются среди различных групп, относящихся и к хемотрофам (азотобактер, клостридии), и к фототрофам (цианобактерии, прохлорофиты).

Наиболее изученными аэробными свободноживущими азотфиксаторами являются представители рода *Azotobacter*.

*Azotobacter chroococcum* - кокковидные клетки размером 3-7 мкм в виде диплококков в едином слизистом чехле. Старые колонии темнеют до темно-серого и темно-коричневого цвета. Активность азотфиксации до 20 мг азота на 1 г потребленного органического вещества.

Из анаэробов распространены бактерии вида *Clostridium pasteurianum*. Бактерии осуществляют маслянокислое брожение, активность азотфиксации - 12 мг азота на 1 г потребленного органического вещества.

Для обнаружения природных азотфиксаторов используют синтетические среды, в которых отсутствуют источники азота. Например, среда Эшби.

Восстановление сульфатов, так же как и нитратов, может происходить с двумя целями: либо восстановленная до S<sup>0</sup> сера используется в процессах анаболизма; либо сульфатное дыхание — сероводород выделяется в окружающую среду. К сульфатредуцирующим бактериям относится множество родов и видов из разных таксономических групп, многие строгие анаэробы. Для получения анаэробных сульфатредукторов используют среду Постгейта и максимально анаэробные условия культивирования.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Посев на среду Эшби для получения накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов. Посев на среду Постгейта для получения накопительной культуры сульфатредукторов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Термостат 28-30°C.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Колбы объемом по 100 мл с 30 мл среды Эшби; пробирки, доверху наполненные средой Постгейта. Комочки почвы.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Свободноживущие азотфиксаторы. Сульфатредуцирующие бактерии.

**Задание 1. Посев накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов**

1. В колбу со средой Эшби внесите по одному комочку почвы (1/2 чайной ложки). Закройте ватно-марлевыми пробками.

2. Поместите колбы в термостат при 28-30 С на 5-6 суток.

3. Запишите условия посева и выращивания свободноживущих азотфиксаторов.

Задание 2. Посев накопительной культуры сульфатредукторов

1. В пробирки со средой Постгейта внесите 1 мл болотной воды.
2. Закройте резиновыми пробками и залейте парафином.
3. Поместите пробирки в термостат на выращивание на 14 суток.
4. Запишите в тетради условия посева и выращивания сульфатредукторов.

### Занятие № 30

Анализ накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов

На 5-6-е сутки на поверхности среды Эшби образуется бурая пленка, в которой при микроскопировании обнаруживаются кокковидные, достаточно крупные, собранные в скопления по две клетки азотобактера. Электронными условиями для развития азотобактера становятся отсутствие в среде соединений азота, аэрация, присутствие соединений фосфора и кальция, в которых нуждаются представители данного рода.

Если наблюдается вспенивание жидкости в колбе и появляется запах масляной кислоты, то это указывает на развитие на дне колбы в относительно анаэробных условиях бактерий вида *Clostridium pasteurianum*.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп БИОЛАМ, С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Черная тушь, раствор Люголя. 2 %-ный раствор хлорного железа. Пробирки. Иммерсионное масло.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Свободноживущие азотфиксаторы.

Задание 1. Анализ накопительной культуры азотфиксаторов

1. Опишите внешний вид накопительной культуры в колбах.
2. Из пленки на поверхности приготовьте постоянный препарат, негативно окрашенный тушью.
3. Микроскопируйте препарат при увеличении 15x90 в иммерсионной системе. Зарисуйте клетки азотобактера, сделайте необходимые обозначения.
4. Приготовьте препарат «раздавленная капля» в каплю раствора Люголя (для окраски гранулезы), взяв на петлю образец со дна пробирки.

5. Промикроскопируйте при увеличении 15х90 с иммерсией. Зарисуйте и отметьте особенности морфологии кластридий.

Задание 2. Обнаружение в культуральной жидкости масляной кислоты

1. 5 мл жидкой среды из накопительной культуры перенесите в пробирку.

2. Добавьте 2 мл 2 %-ного раствора хлорного железа. Нагрейте до кипения.

3. Пары образующегося маслянокислого железа в проходящем свете имеют кроваво-красный цвет.

### Занятие № 31

Анализ накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий

Через 14 суток инкубации на среде можно наблюдать почернение культуральной жидкости за счет образования сульфида железа. В культуральной жидкости можно обнаружить представителей рода *Disulfotomaculum* — палочковидные спорообразующие бактерии. Возможно обнаружение и других представителей сульфатредуцирующих бактерий.

**ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ.** Анализ накопительной культуры сульфатредукторов.

**ОБОРУДОВАНИЕ.** Микроскоп БИОЛАМ, С-11 с осветителем ОИ-31; бактериологическая петля, песочные часы, кристаллизатор с мостиком, горелка, колба с водопроводной водой.

**РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ.** Раствор водного фуксина. Иммерсионное масло.

**ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ.** Сульфатредуцирующие бактерии.

Задание. 1. Анализ накопительной культуры сульфатредукторов

1. Приготовьте постоянный препарат накопительной культуры сульфатредукторов.

2. Промикроскопируйте препарат при 15х90 в иммерсионной системе.

3. Зарисуйте препарат, отметьте характерные морфологические признаки сульфатредуцирующих бактерий.

Задание 2. Оформление отчета об изучении отдельных групп бактерий

1. Представление результатов анализа роста накопительных культур.

2. Сдача преподавателю рисунков и характеристик морфологических особенностей различных групп бактерий.

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

БГрадова Н.Б., Бабусенко Е.С. Горнова И.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М.: ДеЛи принт, 2004. 144 с.

2. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Издательский центр «Академия», 2003.464 с.

3. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.: Дрофа, 2006.444 с.

4. Ждан-Пушкина С.М., Мовчан Н.А., Щелкунова С.А. Задания к практическим занятиям по микробиологии. Л.: Изд-во Ленинград, ун-та, 1974. 104 с.

5. Лабораторный практикум по микробиологии. Часть 1. Техника микробиологических исследований / сост. Н.А. Трещанина. Самара, 1997. 58 с.

6. Лабораторный практикум по микробиологии. Часть 2. Выделение чистой культуры бактерий / сост. Н.А. Трещанина. Самара, 1997. 32 с.

7. Лабораторный практикум по микробиологии. Часть 3. Изучение свойств выделенного штамма / сост. Н.А. Трещанина. Самара, 1997. 38 с.

8. Практикум по курсу «Микробиология» / сост. О.М. Крепак. Куйбышев, 1989. 48 с.

9. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 1. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса и Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. 656 с.

10. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 2. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса и Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.496 с.

П.Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2005. 256 с.

Составы специальных сред, используемых на лабораторных занятиях

Дрожжевой автолизат. Прессованные пекарские дрожжи нарезают небольшими кусочками и закладывают в емкость с расчетом, чтобы автолизат занимал около 1/5 объема (100 г дрожжей на 0,5 л). Емкость закрывают ватно-марлевой пробкой и ставят в термостат при 60°C на 2 суток. По мере разжижения дрожжей емкость встряхивают для равномерного прогревания содержимого (1—2 раза в сутки). Конец автолиза характеризуется полным разжижением дрожжей. Автолизат должен иметь коричневый оттенок и приятный запах. Качество автолизата ухудшается, если температура становится ниже 58 С. После окончания автолиза в емкость добавляется тройной объем теплой водопроводной воды. Разведенный автолизат стерилизуется при 1 атм., 120 С в течение 30 минут.

Плотная среда Сабуро для культивирования дрожжей и грибов. Основной среды служит дрожжевая вода. На 1 л водопроводной воды берут 80 г прессованных или 20 г сухих дрожжей, кипятят 15 минут, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по флаконам и стерилизуют при 1 атм. 20 минут. К 100 мл стерильной дрожжевой воды добавляют 1 % пептона, 2 % агара, нагревают до растворения агара, затем добавляют 4 % глюкозы (или мальтозы), фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут. Среду можно готовить на 1 %-ном пептоне. После стерилизации среду в пробирках скашивают.

Жидкая среда Сабуро. Отличается от вышеописанной отсутствием агара. Среду разливают в колбы по 150-200 мл и стерилизуют.

Среда Чапека (для грибов), в г/л:

$\text{NaNO}_3$  - 2;  $\text{KCl}$  - 0,5;  $\text{KN}_2\text{P}_0_4$  - 1;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,01;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5; рН 5,2. Стерилизуют при 0,5 атм. в течение 20 минут. После стерилизации над пламенем горелки добавляют 1-2 % стерильного раствора глюкозы или сахарозы.

Другой вариант: на 1 л: сахароза 20 г,  $\text{NaNO}_3$  — 2,0 г;  $\text{KN}_2\text{P}_0_4$  — 1,416 г;  $\text{MgSO}_4$  - 0,5 г;  $\text{KCl}$  - 0,5 г;  $\text{CaCO}_3$  - 3,0 г, агар - 20 г. Стерилизовать. Перед разливом в среду добавит 4 мл/л стерильной концентрированной молочной кислоты.

Среда Чапека-Докса, в г/л: сахароза - 30,0; нитрат натрия - 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,0; сульфат магния - 0,5; хлорид калия - 0,5; сульфат железа - 0,01; агар-15.

Среда для получения накопительной культуры анаэробных целлюлозоразрушающих бактерий, в %:

$\text{KNH}_4\text{HPO}_4$  - 0,2;  $\text{KN}_2\text{P}_0_4$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,03; пептон - 0,1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,05;  $\text{CaCO}_3$ -0,5.

Также может быть использована среда Ишменецкого: мясо-пептонный бульон 500 мл,  $\text{CaCO}_3$  - 2 г, фильтровальная бумага - 15 г, водопроводная вода - 0,5 л. Среда разливается высоким слоем в пробирку. На дно пробирки помещают полоски фильтровальной бумаги. Пробирки закрывают ватными пробками и стерилизуют. Затем заражают комочком почвы.

Среда для культивирования актиномицетов. Агар на отваре из овсяной муки: 100 г муки в 1 л воды кипятят на водяной бане в течение часа при  $60^\circ\text{C}$ , фильтруют и добавляют 3% агара и стерилизуют.

При изучении актиномицетов используют также среды с глюкозой.

1. В г/л дистиллированной воды: глюкоза - 14,0;  $\text{CaCO}_3$  - 0,7;  $\text{KN}_3$  - 0,7;  $\text{MgSO}_4$  - 0,35;  $\text{NaCl}$  - 0,35;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,35;  $\text{FeSO}_4$  - следы; агар - 20.

2. В г/л дистиллированной воды: глюкоза - 10; натрий лимоннокислый - 11,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,38;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 5,65; (N114)2804 - 2,64;  $\text{MgCl}_2$  - 1,21;  $\text{ZnSO}_4$  - 0,012;  $\text{FeSO}_4$  - 0,11;  $\text{Cl}_2\text{SO}_4$  - 0,006;  $\text{MnCO}_3$  - 0,0012; агар - 20,0.

Среда Ваксмана для актиномицетов (г/л): глицерин - 3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1; нитрит натрия - 2; сульфат магния - 0,5; хлорид калия - 0,5;  $\text{CaCO}_3$  - 0,01; сульфат железа - 0,01. pH 7,0.

Приготовление гелевых пластин для метода Виноградского (получение накопительных культур аэробных целлюлозоразрушающих бактерий). Для приготовления пластин из кремнекислого геля соляную кислоту плотностью 1,9 в цилиндре разбавляют водой до плотности 1,10 (примерно 1 : 1). Жидкое стекло ( $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$  или  $\text{K}_2\text{SiO}_3$ ) наливают в другой цилиндр и разводят дистиллированной водой до плотности 1,06-1,08 (примерно 1 : 5). Для определения плотности использовать ареометры. Полученные растворы кислоты и жидкого стекла смешивают в равных объемах, при этом жидкое стекло осторожно приливают к кислоте, постоянно перемешивая. Чтобы устранить возможность появления в толще геля полостей, полученный раствор нагревают до кипения, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри слоем не менее 0,7 см. Через 8-10 часов образуется гель. Чашки с застывшим и обсохнувшим сверху гелем помещают в большой стеклянный сосуд и ставят под кран для промывания. На водопроводный кран надевают трубку, конец которой опускают на дно сосуда. Струя воды должна быть слабой. Промывание осуществляют в течение 5-7 дней. Отмытые от следов хлора (проверить по реакции с  $\text{AgNO}_3$ ) чашки с кремневыми пластинами окунают в кипящую воду или стерилизуют в кипятильнике Коха при  $100^\circ\text{C}$  3 раза по 30 минут через каждые 24 ч.

Промытые и стерилизованные гелевые пластины пропитывают 2-3 мл среды следующего состава (в г/200 мл дистиллированной воды):  $\text{KN}_3$  - 2,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,01;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,01.

Среда Гетгинсона (для аэробных целлюлозоразрушающих бактерий). В г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0Д;  $\text{NaCl}$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,1;  $\text{FeCl}_3$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3;  $\text{NaN}_3$  - 2,5; агар - 2%.

Аэробные целлюлозоразрушающие бактерии количественно можно учесть на среде Имшенецкого и Солнцевой.

Среда Имшенецкого и Солнцевой. В %:  $\text{NaNO}_3$  - 0,25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4$  - 0,03;  $\text{NaCl}$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,01;  $\text{CaCO}_3$  - 0,5; добавлять углекислый кальций необязательно.

Среда Рана для выявления жирокисляющих бактерий. В г/л дистиллированной воды:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 5;  $\text{CaCl}_2$  - 1;  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  - 5;  $\text{NaCl}$  - следы;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1;  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - следы.

Среда Гильтая для выделения денитрифицирующих бактерий. 1-й раствор (в г/250 мл воды):  $\text{KNO}_3$  - 2,1; аспарагин - 1,0; 2-й раствор (г/50 мл воды):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,0;  $\text{MgSO}_4$  - 2,0;  $\text{CaCl}_2$  - 0,2;  $\text{FeCl}_3$  - следы; лимоннокислый натрий - 5,0.

Растворы 1-й и 2-й сливают и доводят объем до 1000 мл дистиллированной водой, рН 7,0. Среду разливают высоким слоем в пробирки и стерилизуют.

Среда для культивирования простейших (в г/100 мл). Глюкоза - 0,5; пептон - 0,2; морская соль - 0,1; дрожжевой экстракт - 0,1 мл.

Среда Зарука (для культивирования цианобактерий) (г/л):  $\text{NaNCO}_3$  - 6,0;  $\text{FeSO}_4$  - 0,01;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 1,0; ЭДТА - 0,08.

Среда Эшби для культивирования азотобактера. В г/л дистиллированной воды: сахароза - 20,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2;  $\text{MgSO}_4$  - 0,2;  $\text{NaCl}$  - 2,0;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  - 0,1;  $\text{CaCO}_3$  - 5,0; агар - 20,0.

Среда Постгейта для выращивания сульфатредукторов. Раствор 1, в г:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1;  $\text{NFL}_2\text{Cl}$  - 1;  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 2; лактат натрия - 70%-ный раствор - 3,5 мл; дрожжевой экстракт - 1 мл, рН 7,4; дистиллированная вода - 980 мл. Раствор 2, в г:  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5; дистиллированная вода - 10 мл. Раствор 3, в г: аскорбиновая кислота - 0,1; тиюгликолят натрия - 0,1; рН 7,4; дистиллированная вода - 10 мл.

Растворы стерилизуют отдельно, затем сливают и разливают по стерильным пробиркам до самого верха.

Мясо-пептонный желатин. На 1 л мясо-пептонного бульона 100-150 г желатина. В случае 10 % МПЖ температура плавления составляет 24°C; в случае 15 % - 25°C.

После растворения желатина при осторожном нагревании проверяют рН среды. Она должна быть слабощелочная. Кипятят 5 минут, охлаждают до 40-50°C. Взбитый с небольшим количеством воды яичный белок вливают в охлажденную желатиновую среду, хорошо взбалтывают и снова нагревают. Среда после выпадения белков в осадок должна стать прозрачной. Ее фильтруют в горячем виде через бумажный фильтр и стерилизуют.

Крахмало-аммиачная среда (г/л): растворимый крахмал - 10; сульфат аммония - 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1; хлорид натрия - 1;  $\text{CaCO}_3$  - 3; агар - 15.

## Приготовление красителей для лабораторных занятий

1. *Феноловый раствор генциан-виолетта*: генциан-виолетта - 1 г; спирта этилового 96 %-ного - 10 мл; фенола кристаллического - 2 г; вода дистиллированная - 100 мл. Можно использовать *спиртовой раствор генциан-виолетта*: генциан-виолетта - 1 г; спирта этилового 96 %-ного 100 мл, глицерина - 5 мл. Флакон со смесью поместить в термостат на 24 часа, профильтровать.

2. *Раствор Люголя*: йодид калия - 2 г; йод кристаллический - 1 г; вода дистиллированная - 300 мл. Сначала готовят концентрированный раствор йодида калия в 5 мл воды, в нем растворяют йод, затем воду доводят до 300 мл.

3. *Карболовый фуксин Циля*: фуксин основной - 1 г; фенол кристаллический - 5 г; спирт этиловый 96 %-ный - 10 мл; глицерин - несколько капель; вода дистиллированная - 100 мл. Основной фуксин растворить в этаноле и добавить растворенный в воде фенол. Раствор тщательно перемешать и оставить на несколько дней. Перед использованием профильтровать.

4. *Фуксин основной*: фуксин основной — 10 г; этанол 96 %-ный — 100 мл.

5. *Фуксин Пфейфера (водный раствор карболового фуксина Циля)*: 1 мл карболового фуксина Циля и 9 мл дистиллированной воды.

6. *Насыщенный раствор метиленового синего*: 3 г красителя и 100 мл 96 %-ного этилового спирта. Раствор оставить на 2-3 дня, несколько раз перемешать, отфильтровать.

7. *Метиленовый синий по Лёффлеру*: 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешать со 100 мл 0,01 %-ного раствора КОН.

8. *Метиленовый синий 1:40*: 1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 40 мл дистиллированной воды.

9. *Судан III*: 0,1 г судана III растворить в 200 мл 96 %-ного этилового спирта или концентрированной (40 %-ной) молочной кислоты.

10. *Приготовление туши*. Одну часть туши смешивают с девятью частями дистиллированной воды и стерилизуют в пробирках, закрытых ватными пробками, либо в тушь можно добавить несколько капель формалина. Тушь выдерживают две недели, пока все взмученные частицы не осядут на дно. Для окрашивания препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшейся жидкости.

11. *Приготовление фильтровальной бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом*: нарезать полоски фильтровальной бумаги, погрузить их на 5—10 минут в 5 %-ный водный раствор уксуснокислого свинца, высушить на воздухе. Стерилизовать в чашках Петри автоклавированием при 0,5 атм.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	3
------------------	---

### **Часть I. Техника микробиологических исследований**

<i>Тема 1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Методы изучения и культивирования микроорганизмов.....</i>	<b>4</b>
<i>Занятие № 1. Правила работы с микроскопом. Особенности микроскопирования в микробиологии.....</i>	5
<i>Занятие № 2. Правила работы с культурами микроорганизмов. Методы приготовления прижизненных препаратов.....</i>	12
<i>Занятие № 3. Правила работы с культурами микроорганизмов. Методы приготовления постоянных препаратов.....</i>	17
<i>Занятие № 4. Изучение морфологических особенностей прокариотических клеток.....</i>	19
<i>Занятие № 5. Методы и условия посевов и культивирования микроорганизмов.....</i>	24
<i>Занятие № 6. Посевы микроорганизмов из различных сред обитания. Бактериологическое исследование воздуха закрытых помещений.....</i>	32
<i>Занятие № 7. Количественный учет бактерий и микроскопических грибов в почве и воздухе.....</i>	39

### **Часть II. Выделение чистой культуры бактерий. Изучение физиолого-биохимических свойств бактерий**

<i>Тема 2. Получение чистых культур. Цитохимические методы изучения микроорганизмов.....</i>	45
<i>Занятие № 8. Анализ накопительной культуры бактерий. Посев и выращивание клона методом Коха.....</i>	46
<i>Занятие № 9. Анализ чистоты клона бактерий. Посев и выращивание чистой культуры.....</i>	48
<i>Занятие № 10. Анализ чистой культуры бактерий. Окраска по методу Грама.....</i>	50
<i>Занятие № 11. Выявление углеводных внутриклеточных включений бактерий.....</i>	53
<i>Занятие № 12. Окраска липидных внутриклеточных скоплений.....</i>	55
<i>Занятие № 13. Выявление волютиновых включений у дрожжей и бактерий.....</i>	57
<i>Занятие № 14. Выявление эндоспорообразования у бактерий.....</i>	59

<i>Тема 3. Изучение физиолого-биохимических признаков выделенных бактерий</i> .....	62
---	----

<i>Занятие № 15. Посев чистых культур на дифференциально-диагностические среды Гисса</i> .....	62
<i>Занятие № 16. Анализ посевов на среды Гисса. Посев на среды с желатиной и крахмалсодержащую среду</i> .....	65
<i>Занятие №17. Анализ посевов культур на среду с желатином и агаризованным крахмалом</i> .....	67
<i>Занятие № 18. Определение чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам</i> .....	69
<i>Занятие № 19. Анализ антибиотической устойчивости выделенных культур</i> .....	75

### Часть III. Превращение микроорганизмами органических веществ. Эволюция прокариот

<i>Тема 4. Изучение отдельных групп бактерий</i> .....	78
<i>Занятие № 20. Микроскопическое изучение молочнокислых бактерий</i> .....	78
<i>Занятие №21. Микроскопирование маслянокислых бактерий</i> .....	81
<i>Занятие № 22. Брожение и кислородное окисление целлюлозы</i> .....	82
<i>Занятие № 23. Анализ роста накопительных культур целлюлозоразрушающих бактерий. Определение целлюлазной активности</i> ....	84
<i>Занятие № 24. Анализ роста аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов</i> .....	86
<i>Занятие № 25. Посев накопительной культуры денитрификаторов</i> ..	88
<i>Занятие № 26. Анализ накопительной культуры почвенных денитрификаторов</i> .....	90
<i>Занятие № 27. Получение накопительной культуры аммонификаторов</i> .....	91
<i>Занятие № 28. Анализ накопительной культуры почвенных аммонификаторов. Определение их протеолитической активности</i> .....	92
<i>Занятие № 29. Обнаружение свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов. Получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий</i> .....	94
<i>Занятие № 30. Анализ накопительной культуры свободноживущих азотфиксаторов</i> .....	95
<i>Занятие №31. Анализ- накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий</i> .....	96
Список рекомендуемой литературы.....	97
Приложения.....	98