

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра микробиологии

## **МИКРОБИОЛОГИЯ**

**Методические рекомендации к лабораторным  
занятиям, контроль самостоятельной работы  
студентов**

*Для студентов биологического факультета*

МИНСК  
2002

УДК 579.8 + 579.232 + 579.06  
ББК

Авторы – составители:  
**В.В.Лысак, Р.А.Желдакова**

Рецензент  
кандидат биологических наук, доцент Титок М.А.

**Микробиология:** методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / Авт.-сост. В.В.Лысак, Р.А.Желдакова. - Мн.: БГУ, 2002. - 100 с.

В учебно-методическом пособии приводятся рекомендации по выполнению лабораторных заданий по курсу «Микробиология», а также формы контроля самостоятельной работы студентов.

Предназначено для студентов 3-го курса дневного и 4-го курса заочного отделений биологического факультета специальностей G 31 01 01 «Биология» и H 33 01 01 «Биоэкология».

**УДК 579.8 + 579.232 + 579.06**  
**ББК**

© БГУ, 2002

## **1. ОСНАЩЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ**

Микробиологические лаборатории обычно снабжены следующим оборудованием:

1. Биологическими иммерсионными микроскопами с дополнительными приспособлениями и наборами необходимых красителей.
2. рН-метрами, дистилляторами, центрифугами, техническими и аналитическими весами, аппаратурой для фильтрования и др.
3. Набором инструментов: бактериологическими петлями, микробиологическими шпателями, пинцетами, спиртовками и др.
4. Лабораторной посудой: пробирками, чашками Петри, флаконами, пипетками и др.
5. Приборами для стерилизации оборудования, питательных сред и реактивов.
6. Необходимыми средствами пожарной и химической безопасности (огнетушителями, дезинфицирующими растворами и т. д.).

Основное правило работы в микробиологической лаборатории – правильная организация работы. При этом следует придерживаться следующего:

1. К работе в лаборатории допускаются лица после прохождения инструктажа по технике безопасности.
2. Все должны работать в медицинских халатах. Вход без халата воспрещен.
3. В лаборатории запрещается курить и принимать пищу.
4. Рабочее место должно содержаться в образцовом порядке, а личные вещи храниться в специально отведенных местах.
5. При случайном попадании биологического материала на стол и т. д. это место необходимо тщательно вытереть дезинфицирующим раствором.
6. Результаты работы следует заносить в рабочий журнал.
7. После окончания работы следует вымыть руки.

## **2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**

Известно значительное количество питательных сред, используемых для культивирования и поддержания (сохранения) микроорганизмов. Питательной средой в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или

промышленных условиях. Еще в 1930 году их было классифицировано не менее двух тысяч наименований, но число ингредиентов, являющихся их неотъемлемыми компонентами, относительно невелико, а их композиции создаются на определенных общих принципах. Для размножения любых бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и биохимические питательные компоненты. Любая питательная среда должна соответствовать следующим требованиям: содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме; иметь оптимальную влажность, вязкость, рН, быть изотоничной, сбалансированной с высокой буферной емкостью и, по возможности, прозрачной. Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Например, бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют  $\text{CO}_2$  и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Гетеротрофные бактерии получают энергию в результате окисления (диссимиляции) восстановленных углеродных соединений.

Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа  $\text{CO}_2$ , органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *E.coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**. Организмы, которые нуждаются в их добавлении к ростовой среде, называются **ауксотрофными** по соответствующим соединениям. Другая группа организмов, способная к росту на простых средах, содержащих источник углерода и энергии, а также набор основных биогенных элементов, получила название **прототрофных**. Следует учитывать и то, что в природе встречаются бактерии, которые способны размножаться в местах с низким пищевым потоком углерода – до 0,1 мг/л в день. Они получили название **олиготрофных**, противоположную группу для них составляют бактерии **копиотрофные** – способные к росту на богатых пищевых субстратах.

Выбор питательной среды зависит в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их следующих особенностей. По составу питательные среды делятся на **натуральные** и **синтетические**. Натуральными называют среды, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения, имеющих неопределенный химический состав. Примерами питательных сред такого типа являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, мышц млекопитающих), образующихся при их гидролизе. Кислотный (НСI) гидролиз белков используется для приготовления полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина, панкреатина, папаина, приводит лишь к частичному (неполному) гидролизу белков, в результате чего образуются **пептоны**. Как правило, на пептонных питательных средах микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. При ферментативном гидролизе, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих небольшие пептиды, потому что их они могут усваивать непосредственно, а отсутствующие аминокислоты – нет. Обычно в составе такой среды ферментативный гидролизат белка обеспечивает потребность в таких источниках азота, как аминокислоты, углеводы (глюкоза), используется как источник углерода и энергии, соли удовлетворяют потребности бактерий в неорганических ионах, а дрожжевой экстракт обеспечивает потребности в витаминах. К питательным средам неопределенного состава можно отнести и среды, полученные на основе растительного сырья: картофельный агар, томатный агар, отвары злаков, дрожжей, пивное сусло, настои сена и соломы и др. Основное назначение таких питательных сред – выделение, культивирование, получение биомассы и поддержание культур микроорганизмов.

К числу сред неопределенного состава относят и среды **полусинтетические**. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; а также добавляют небольшое количество дрожжевого или кукурузного экстракта (или любого другого природного продукта) для обеспечения неизвестных потребностей роста. Такие среды часто используются в случае промышленного культивирования биологических объектов для получения продуктов метаболизма.

**Синтетические среды** – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно

указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Обязательными компонентами таких сред являются неорганические соединения (соли) и углерод- и азотсодержащие вещества (типичными представителями являются глюкоза и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. Основное назначение таких питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетических рекомбинантов и т. д.

**По назначению** среды разделяют на **элективные** и **дифференциально-диагностические**. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды. В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить клоны, сбраживающие лактозу от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный (пептонный) агар, углевод и основной фусин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бес-

цветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развививается красная окраска соответствующих колоний. Среда с эозином и метиленовым синим (среда Левина) в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий и исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Подобные изменения окраски происходят потому, что красители присутствуют в среде не в виде самостоятельных соединений, а в виде комплексов с веществами питательной среды. При низких значениях рН эти комплексы выпадают в осадок, исходные же красители в этих условиях растворимы, при больших рН комплексы красителей бесцветны, тогда как метиленовый синий приобретает синюю окраску. Данная среда позволяет дифференцировать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*.

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

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии со времен Р. Коха. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции.

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатина, силикагель, каррагенан. Наиболее распространенным из уплотнителей является агар – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из двух полисахаридов – агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С ; 3) не

расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) обычно используемые концентрации 1,5 - 2,0 % являются относительно невысокими и их использование экономично.

Желатина – белок, приготовленный из кожи и костей, – в настоящее время используется для специальных целей, поскольку образуемый ею гель плавится при температурах около 25°С – 30°С. Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов. «Уплотняющая» концентрация желатины – 17 – 20 %.

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

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

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

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



Определение состава питательной среды предполагает, что при этом будут учтены и такие биофизические факторы как рН среды, температура, подача и удаление молекулярного кислорода, являющиеся критическими для роста любой бактериальной культуры. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования, окислительно-восстановительный потенциал зависит как от состава ростовой среды, так и от условий культивирования. Контроль окислительно-восстановительного потенциала особенно важен при культивировании облигатно-анаэробных бактерий.

В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах – триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин) и питательный агар. Сухие среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке, имеют относительно стандартный состав.

### **3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, сильно зависит от физических и химических факторов (температура, кислотность, аэрация, свет и т. д.). При этом количественные показатели каждого из них неодинаковы и определяются особенностями метаболизма каждой группы бактерий. Можно выделить методы культивирования на твердых и в жидких питательных средах; в аэробных, анаэробных и микроаэрофильных условиях. Характеристики этого процесса устанавливают путем измерения таких показателей как число клеток или их биомасса.

#### **Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды**

Посев микроорганизмов осуществляется бактериологической петлей. Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку таким образом, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцами правой руки, прижимая пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время всех дальнейших манипуляций. Край открытой пробирки обжигают в пламени спиртовки и вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают, прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной

от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, ватную пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе. Оставшиеся на петле после пересева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки.

### **Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду**

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

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

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

При пересеве микроорганизмов **методом реплик** используют стерильные кусочки бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на специальный столик для реплик, диаметр которого меньше диаметра чашки Петри, и закрепляют металлическим кольцом. Чашки Петри с питательной средой и сформировавшимися колониями микроорганизмов накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают. На чашке делают отметку, соответствующую той, которая находится на столике для реплик. Чашку осторожно снимают, а бархат с отпечатками колоний после этого может служить исходным штампом для засева других чашек со средой. Возможно

снятие отпечатков на серию чашек, содержащих различные среды. В качестве контроля в последнюю очередь производится отпечаток на чашку со средой, на которой находились исходные микроорганизмы.

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

В некоторых особых случаях используют выращивание бактерий в **полужидких средах**, которые содержат уплотняющее вещество в низкой концентрации и имеют мягкую желеподобную консистенцию. Такая среда пригодна для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1 – 0,4 % агара, гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей, микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы начинают расти в нижней части полужидкой среды.

### **Техника культивирования анаэробных микроорганизмов**

Граница между аэробными и анаэробными микроорганизмами является относительно условной. Хотя облигатными анаэробами обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода, на практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении. Аэротолерантные бактерии хорошо растут на поверхности агара и чашках при низком уровне кислорода. Степень анаэробноза измеряется по окислительно-восстановительному (редокс, Eh) потенциалу среды. При увеличении Eh выше – 100 мВ, обусловленном присутствием растворимого кисло-

рода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. Для удаления кислорода и создания соответствующих условий среды можно воспользоваться следующими методами.

1. **Культивирование в микроанаэроостате** – аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот с 5 % CO<sub>2</sub> и 10 % H<sub>2</sub>.

2. **Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород.** В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионит натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой, а также анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

3. **Использование восстанавливающих агентов,** которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота. Удаления кислорода из среды можно добиться и в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслоить смесь (1:1) масла и парафина, то в таких условиях будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов.

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

#### 4. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Цель процесса стерилизации состоит в полном удалении или уничтожении всех живых микроорганизмов и спор внутри или на поверх-

ности предмета. Стерилизации подвергаются питательные среды, лабораторная посуда, инструменты, растворы и т. д. Можно выделить термическую и холодную стерилизацию.

**К методам термической стерилизации относят:** прокалывание и обжигание в пламени спиртовки; кипячение; сухожаровую (горячим паром) стерилизацию; стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование); дробную стерилизацию (тиндализацию), пастеризацию.

**Прокалывание и обжигание в пламени** – наиболее быстрые и доступные методы стерилизации. Однако их использование ограничивается только термоустойчивыми материалами. Такими методами стерилизуют бактериологические петли, иглы, шпатели, пинцеты, предметные и покровные стекла, фарфоровые ступки и другие инструменты.

**Кипячение** – простейший способ стерилизации. Кипячением в дистиллированной воде стерилизуют мембранные фильтры. Режим стерилизации для мембранных фильтров – 30 – 60 мин с момента энергичного закипания воды. Металлические инструменты, мелкие стеклянные детали лучше всего кипятить в специальных закрытых приборах – стерилизаторах.

В микробиологической практике таким способом стерилизации пользуются редко в связи с тем, что продолжительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильности.

**Дробная стерилизация (тиндализация или стерилизация текучим паром)** используется для стерилизации питательных сред и растворов, которые портятся при использовании температур выше 100 °С. Метод разработан в 1877 году Дж.Тиндалем и согласно этому методу, жидкость доводят до 100 °С и продолжают выдерживать при этой температуре 10 мин. За это время все вегетативные клетки погибают, жизнеспособными остаются только споры. Затем жидкость охлаждают до температуры, оптимальной для прорастания спор (30 °С) и через несколько часов снова пропускают пар. Двух-трех подобных циклов обычно бывает достаточно для уничтожения всех имеющихся спор. Эффективность этого метода особенно велика потому, что нагревание обычно приводит к активации спор. Тиндализацию проводят либо с помощью пара, подаваемого от внешнего источника, либо в специальных аппаратах. Резервуар с кипящей водой расположен в

нижней части аппарата, над ним расположена сетка с устанавливаемыми стерилизуемыми растворами.

**Пастеризация** заключается в однократном прогреве материала при температурах ниже 100 °С и направлена на уничтожение вегетативных клеток. Этот метод широко используется в пищевой промышленности для обработки продуктов, которые теряют вкусовую и пищевую ценность при кипячении: молока, ягодных и фруктовых сиропов, соков, вин, пива и т. д. В микробиологической практике пастеризацией пользуются для получения накопительных культур спорообразующих бактерий. В лабораторных условиях пастеризацию проводят либо на водяной бане либо в ультратермостате при следующих режимах: 60 – 70 °С в течение 15 – 30 мин; 80 °С в течение 10 – 15 мин.

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

**Стерилизация насыщенным паром под давлением или автоклавирование** – один из наиболее эффективных методов стерилизации, так как стерилизуемый объект подвергается одновременному воздействию как высокой температуры, так и повышенному давлению пара. Погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Процесс проводится в специальных приборах – автоклавах, закрывающихся герметично. Основные используемые режимы стерилизации следующие: 15 – 30 мин. при избыточном давлении 0,5 атм (температура достигает 110 – 112 °С); 15-45 мин при избыточном давлении 1,0 атм (температура достигает 121 °С); 10 – 30 мин при избыточном давлении 1,5 атм (температура достигает 126 °С). Таким способом стерилизуют питательные среды, растворы, посуду, инструменты, фильтры и т. д.

**При холодной стерилизации** используют химические вещества или проводят воздействие на объект факторами физической природы. Химические методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов предполагают использование дезинфектантов и антисептиков, имеющих неспецифический эффект, либо использование антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов с избирательным противомикробным действием. Дезинфицирующие вещества классифицируются по группам: кислоты или щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые основания, фенольные соединения, альде-

гиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. Устойчивость микроорганизмов к их действию может существенно меняться в зависимости от таких факторов как концентрация активного компонента, длительность контакта, рН, температура, влажность, и присутствие органического вещества. Химические средства неспецифического действия используются для обработки помещений, оборудования, различных предметов. Например, спирты используются в концентрации 60 – 70 % и эффективны в отношении вегетативных клеток. Фенолы и их производные применяются для дезинфекции помещений, дезинфекции.

Среди используемых летучих стерилизующих веществ можно указать на окись этилена, окись пропилена, озон, метилбромид, формальдегид, глютаровый альдегид. Указанные вещества могут быть использованы для стерилизации пластмассовых центрифужных пробирок, пластмассовых чашек Петри, оптических инструментов, сыворотки крови и др.

**Стерилизация фильтрованием** используется для веществ, которые не выдерживают термической обработки (растворов белков, углеводов, витаминов, углеводов, антибиотиков, сыворотки). Способ заключается в пропускании жидкостей и газов через специальные мелкопористые фильтры (бактериальные), диаметр пор которых не превышает 0,45 – 0,2 мкм. Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление. Существуют два основных типа фильтров – **глубинные и мембранные**. Глубинные состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру и захват ими частиц определяется размером пор. Фильтры содержат различные природные (коалин, асбест, целлюлоза) или синтетические (производные целлюлозы) материалы. Различают фильтры: мембранные, получаемые на основе нитроцеллюлозы; асбестовые или фильтры Зейтца, получаемые на основе смеси асбеста и целлюлозы; фарфоровые или свечи Шамберлана, получаемые из смеси кварцевого песка и коалина, сплавленных между собой; стеклянные, полученные из стекла «Пирекс».

**Стерилизация с использованием облучения** пригодна для термолабильных материалов. Ультрафиолетовые лучи (250 – 270 нм) ис-

пользуются для стерилизации центрифужных пробирок, наконечников для пипеток, материалов из термолабильной пластмассы. Время облучения определяется мощностью лампы, временем воздействия, степенью и видовым составом микроорганизмов загрязненного материала. Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые в 3 – 10 раз более устойчивы. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью или другими защитными оболочками. Ограничением при использовании данного метода стерилизации является низкая проникающая способность УФ-лучей и высокая поглощающая способность воды и стекла. Рентгеновское и  $\gamma$ -облучение также эффективно для стерилизации пластмасс, пищевых продуктов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. Наиболее чувствительны к  $\gamma$ -облучению вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад.  $\gamma$ -облучение используется для стерилизации больничных принадлежностей, антибиотиков, витаминов, гормонов, стероидов, пластмассового разового оборудования, шовного и перевязочного материала.

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

## **5. ПОДДЕРЖАНИЕ (ХРАНЕНИЕ) КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ**

Основная задача хранения культур – поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также определенных свойств, представляющих интерес для науки и практики. Проблема длительного хранения микроорганизмов сводится к созданию условий анабиоза, т. е. торможению процессов обмена веществ. Хранение микроорганизмов осуществляется в специальных коллекциях типовых культур. В коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: 1) периодическими пересевами (субкультивирование); 2) под минеральным маслом; 3) высушиванием; 4) лиофилизацией; 5) в условиях низких и ультранизких температур.

**Субкультивирование** – традиционный метод хранения культур (чаще всего аспорогенных) и заключается он в пересевах культур на



свежие питательные среды один-два раза в месяц. Между пересевами микроорганизмы хранят в темноте при температурах 5 – 20 °С. При использовании этого метода хранения культур должны быть соблюдены три условия: 1) подходящая поддерживающая среда; 2) идеальная температура хранения; 3) необходимая частота пересевов. Преимуществом метода является простота и удобный визуальный контроль за чистотой культуры или ее морфологической изменчивостью, а к недостаткам следует отнести возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и большой расход реактивов.

**Хранение под минеральным маслом** заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла (0,5 – 1,0 см) замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов и предохраняет поверхность среды от высыхания. Покрытые маслом культуры хранят в холодильнике. Большинство сапрофитных бактерий сохраняют жизнеспособность в течение 8 – 14 лет, дрожжи и мицелиальные грибы пересевают через 2 – 3 года. Хранение под маслом имеет следующие преимущества: относительно длительное сохранение стабильности свойств микроорганизмов, сокращение затрат на пересевы.

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

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

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

При хранении бактерий в жидком азоте используют криопротекторы двух типов: глицерин и диметилсульфоксид, которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутри – так и внеклеточную защиту; сахароза, глюкоза, полиэтиленгликоль обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. По 0,4 мл суспензии клеток ( $10^8$  кл/мл) разливают в специальные ампулы, которые запаивают. Далее проводят двухэтапное охлаждение: с медленной (снижение температуры 1 °С / мин) и быстрой (снижение температуры 15 – 30 °С / мин) скоростью. Чтобы оживить заморожен-

ные культуры, их быстро оттаивают при 37 °С. К основным преимуществам криогенного сохранения микроорганизмов можно отнести: малую вероятность заражения культуры, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, небольшие временные и материальные затраты, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята.

Сравнительный анализ использования различных методов хранения культур микроорганизмов приведен в табл. 1.

Таблица 1

**Время выживания бактерий при использовании различных методов их хранения**

Род бактерий	Частота пересевов, месяцы	Время выживания, годы				
		Под минеральным маслом	В стерильной почве	При замораживании	После лиофилизации	В жидком азоте
<i>Actinomyces</i>	1	–	1 – 2	2 – 3	>30	>30
<i>Agrobacterium</i>	1 – 2	1 – 2	1 – 2	–	>30	>30
<i>Bacillus</i>	2 – 12	1	1 – 2	2 – 3	>30	>30
<i>Bifidobacterium</i>	Еженед.	–	–	–	>30	>30
<i>Clostridium</i>	6 – 12	1 – 2	–	2 – 3	>30	>30
<i>Escherichia</i>	1 – 4	1 – 2	–	–	>30	>30
<i>Erwinia</i>	1 – 4	1 – 2	–	–	>30	>30
<i>Neisseria</i>	1	1	–	1 – 2	>30	>30
<i>Nocardia</i>	1 – 4	1	–	1 – 2	>30	>30
<i>Pseudomonas</i>	1 – 3	–	–	1	>30	>30
<i>Streptococcus</i>	1 – 2	1	–	–	>30	>30
<i>Streptomyces</i>	1 – 8	1 – 2	2 – 3	1 – 3	>30	>30
<i>Xanthomonas</i>	1 – 8	–	–	1 – 2	>30	>30

Примечание: «–» – нет данных

**Задание**

1. Провести посеvy культур микроорганизмов в жидкую и на плотную питательные среды.
2. Ознакомиться с техникой подготовки посуды и инструментов для стерилизации.
3. Ознакомиться с работой автоклава, сушильного шкафа.

## 6. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ

**Основными задачами** микроскопии являются следующие:

- Выявление микроорганизмов в различных материалах.
- Ориентировочная идентификация микроорганизмов в исследуемом образце.
- Изучение некоторых морфологических признаков и структур микроорганизмов (например, капсул, жгутиков и т. д.).
- Изучение окрашенных мазков из колоний и чистых культур.

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

При работе с микроскопом Биолам производят следующие действия:

1. Осветитель устанавливают под конденсором в специальном гнезде в основании микроскопа. При этом необходимо снять зеркало, поднять до упора конденсор, отвести в сторону дополнительную линзу конденсора. Затем, перемещая патрон осветителя, добиваются наиболее интенсивного и равномерного освещения поля зрения. Для этого используют суховоздушный объектив малого увеличения ( $\times 8$ ).

2. В центральной части столика микроскопа устанавливают препарат.

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

4. Если исследования проводятся с помощью иммерсионной системы (увеличение  $\times 90$ ), то в центр препарата следует нанести каплю иммерсионного масла, осторожно перевести объектив микроскопа вниз таким образом, чтобы дотронуться до предметного стекла. Затем,

глядя в окуляр, поднять объектив вверх с помощью макровинта до появления в поле зрения микроорганизмов. С помощью микровинта добиваются максимальной четкости изображения.

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

**Фазово-контрастная микроскопия** представляет ценность в том, что с ее помощью можно наблюдать живые объекты, которые имеют коэффициенты преломления, близкие к коэффициентам преломления среды. С точки зрения увеличения никакого выигрыша не происходит, однако прозрачные объекты видны более четко, чем в проходящем свете обычного светлпольного микроскопа. При отсутствии специального микроскопа обычный световой может быть оснащен специальным фазово-контрастным устройством, которое переводит фазовые изменения световых волн, которые проходят через объект, в амплитудные. В результате этого живые прозрачные объекты становятся контрастными и видными в поле зрения.

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

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

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

**Люминесцентная микроскопия** основана на способности ряда веществ биологического происхождения или некоторых красителей све-

тяться под действием падающего на них света. Микроорганизмы, содержащие хлорофилл, витамин В<sub>12</sub>, алкалоиды, некоторые антибиотики, обладают первичной люминесценцией. Клетки микроорганизмов, в которых люминесценция слабо выражена или отсутствует, обрабатывают специальными красителями – флуорохромами (акридиновый оранжевый, примулин, родамин и др.) в виде сильно разбавленных водных растворов: 1:500 – 1:100000. Такие растворы слабо токсичны, что дает возможность изучать неповрежденную клетку. В зависимости от химического состава клеточные структуры в разной степени адсорбируют красители и люминесцируют различным образом. Кроме того, флуорохромы неодинаково адсорбируются живыми и мертвыми клетками. Это позволяет использовать данный вид микроскопии для цитологических и иммунологических исследований, определения жизнедеятельности клеток, изучения микроорганизмов в почве, воде и т. д. Проведение люминесцентной микроскопии предполагает использование специальных микроскопов (например, МЛ-2).

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

**Электронная микроскопия** позволяет обнаружить объекты, которые не разрешаются при использовании световых или ультрафиолетовых лучей. Короткая длина волны электронов, которая уменьшается в прямой зависимости от подаваемого ускоряющего напряжения, позволяет различить объекты размером 0,5 – 1,0 нм (или большие чем 0,0002 мкм). В современных электронных микроскопах достигается увеличение на экране или пленке 5000 – 15000. Благодаря столь высокому разрешению становится возможным выявление деталей бактериальных структур. Например, с помощью напыления солей тяжелых металлов, окружающих бактерию и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект получил название **негативного контрастирования**.

Детали внутреннего строения выявляют на срезах бактерий, залитых в полимерный материал. Предварительно бактерии фиксируют и обрабатывают солями тяжелых металлов для получения необходимого контраста. Часть электронов проходит через образец, а другие рассеиваются компонентами структуры, в результате чего формируется изо-

бражение на экране или пленке. Электронный микроскоп, в котором изображение формируется благодаря прохождению (просвечиванию) электронов через образец, называют **просвечивающим (или трансмиссионным)**.

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

При **методе сколов (замораживании–оттаивании)** проводят изучение внутреннего строения клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота (– 196 °С) в присутствии криопротектора и используют для получения сколов. Плоскости скола проходят через гидрофобную середину двойного слоя липидов. Обнаженную внутреннюю поверхность мембран оттеняют платиной. Полученные реплики изучают в сканирующем электронном микроскопе.

Помимо вышеуказанных разработаны также и другие методы визуализации:

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

## **7. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ, СТРУКТУРА И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

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

**Кокки** (сферические) клетки могут быть одиночными (микрочкокки), парными (диплококки, например, нейссерия); тетракокки, располагающиеся по 4 в форме квадратов; пакетобразные кокки, располагающиеся «этажами» (сарцины); располагающиеся цепочками (стрептококки); образующие бесформенные скопления в виде виноградных гроздьев (стафилококки). Диаметр клеток – 1 – 2 мкм.

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

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

**Нитчатые бактерии** – это цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или дисковидных клеток. Типичными представителями данных бактерий являются бактерии, окисляющие серу (*Beggiatoa*, *Thiotrix*).

**К мицелийобразующим** бактериям относятся истинные актиномицеты, которые имеют сильно разветвленный мицелий. У нокардий и микобактерий мицелий является временным и возникает на определенных стадиях роста. У коринеподобных бактерий клетки имеют только тенденцию к ветвлению, но при росте культуры наблюдается плейоморфизм клеток.

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

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



**Архебактерии** представляют собой группу бактерий с клеточной стенкой уникальной структуры, содержащей специфические химические соединения. Морфологически могут быть неправильной формы, сферическими, палочковидными.

В микробиологической практике для изучения морфологии бактерий используют неокрашенные препараты (нативный материал) или окрашенные препараты (мазки), приготовленные из естественный образцов либо из колоний выросших микроорганизмов.

**Нативные препараты** готовят для исследования живых неокрашенных бактерий. Наиболее распространенными являются методы «висячей капли», «раздавленной капли», микрокамеры с плотными средами. Для прижизненного изучения бактерий часто используют фазово-контрастную и темнопольную микроскопию.

**Препарат «раздавленная капля»** готовят на предметном стекле, на которое наносят каплю воды. В нее стерильной бактериологической петлей вносят небольшое количество исследуемой культуры, эмульгируют и накрывают покровным стеклом. Избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Если исследуют бульонные культуры, то на предметное стекло наносят непосредственно ее каплю. Препарат микроскопируют с использованием иммерсионной системы (увеличение  $\times 40$  или  $\times 90$ ).

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

**Микрокамеры с плотными средами** готовят на стерильных предметных стеклах с тонким слоем питательного агара. С помощью пастеровской пипетки наносят бактерии. Обрезают агар вокруг выбранной области, кладут сверху покровное стекло. Для предотвращения высыхания такие препараты либо инкубируют в закрытой камере, либо герметизируют щели между стеклами путем заливки парафином или воском.

Окрашенные препараты бактерий готовят в следующей последовательности. **Приготовление мазка:** на чистое и обезжиренное пред-

метное стекло наносят культуру исследуемого микроорганизма, тщательно размешивают и распределяют полученную суспензию по поверхности стекла. Для приготовления отпечатка вырезают блок агара и помещают на покровное стекло бактериями вниз и резко прижимают блок к стеклу, после этого препарат сразу же фиксируют.

**Высушивание** мазка проводят при комнатной температуре.

**Фиксация мазка** чаще всего осуществляется термически (фламбирование), т. е. над пламенем горелки. Хотя данный метод фиксации и является достаточно грубым, но сохраняет морфологию и отношение бактерий к красителям. Препарат проносят 2 – 4 раза над пламенем спиртовки мазком вверх (стекло должно нагреться до такой степени, чтобы при прикосновении к тыльной стороне ладони вызывало легкое жжение). Фиксация мазка преследует следующие цели: а) инактивировать микроорганизмы; б) закрепить их на поверхности стекла и предотвратить их смывание при последующем окрашивании; в) повысить восприимчивость клеток к красителям.

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

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

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

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

Основные цвета окрашивания могут быть следующими: красный (основной фуксин, кислый фуксин, сафранин, конго красный); фиолетовый (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый); синий (метиленовый синий, толуидиновый

синий, водный синий); зеленый (малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый).

Способность клеток воспринимать различные красители отражает их **тинкториальные** свойства. Это определяется структурой и составом клеточной стенки.

Выделяют простые и сложные (дифференцирующие) методы окраски.

**Простыми методами окрашивания** называют окрашивание препаратов каким-либо одним красителем. Чаще всего при этом используется фуксин, генциановый фиолетовый, метиленовый синий. В случае использования негативных красителей среда, в которой находятся микроорганизмы, становится полупрозрачной; в результате клетки, в которые краситель не проникает, выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном фоне. Некоторые микроорганизмы, например спирохеты, плохо выявляемые с помощью позитивных красителей, легко выявляются при окрашивании негативными красителями. Споры имеют вид преломляющих свет включений в вегетативной клетке.

**Техника приготовления препарата** заключается в следующем. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, которые лежат над кюветой. На мазок наносят 1 % водный раствор фуксина или метиленового синего на 1 – 2 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя не подсыхал. После завершения окрашивания препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают, промокая его фильтровальной бумагой, наносят на окрашенный сухой мазок каплю иммерсионного масла и микроскопируют с иммерсионной системой.

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

**Окраска по методу Грама** является самым универсальным из сложных методов окраски. Окраска положена в основу дифференциации бактерий и отражает способность клеток воспринимать и удерживать внутри клетки красящий комплекс генцианового фиолетового и

иода либо терять его после обработки спиртом. Соответственно выделяют грамположительные (*Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Sarcina*, etc.) и грамотрицательные (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Neisseria*, *Rickettsia*, etc.) формы.

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

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

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

4. Препарат промывают водой.

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

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. **Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.**

**Окраска кислотоустойчивых бактерий по методу Циля-Нильсена** отражает особенности некоторых микобактерий и нокардий. Эти бактерии не окрашиваются обычными методами, однако если при окрашивании используются фенол, детергенты или нагревание, то окрашенные клетки получить удастся. В этом случае окраска клеток сохраняется даже при последующем обесцвечивании в смеси кислоты-спирт. Кислотоустойчивость обусловлена большим содержанием в клетке сложных липидов, в частности, миколовых кислот.

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

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

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

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

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

6. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. **Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некислотоустойчивые – в синий.**

### Задание

1. Провести окраску бактерий зубного налета с использованием простых методов.
2. Провести окраску бактерий по методу Грама.

### Эндоспоры бактерий

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

Бактериальные споры могут быть выявлены с использованием как простых, так и сложных методов окраски. Например, с использованием 7 % водного раствора нигрозина микроорганизм окрашивается в зеленый цвет, споры – бесцветные, а фон – черный. Наиболее часто используемым сложным методом окрашивания эндоспор является **метод Шефера – Фултона**.

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

2. Фильтровальную бумагу снимают, препарат промывают водой и в течение 30 с докрашивают 0,5 % раствором сафранина.

3. Препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсионной системой. **Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетка – в красный.**

## Капсула бактерий

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

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

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

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

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

3. Мазок высушивают на воздухе.

4. Микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой. **На темном фоне препарата видны розовые клетки микроорганизмов, окруженные бесцветной капсулой.**

## Цитоплазматические включения

У многих бактерий, выращиваемых в определенных условиях, в результате обменных процессов в цитоплазме образуются отложения, которые называют **включениями**. Среди них – отложения жира, поли-β-гидрооксимасляной кислоты, полифосфатов, полисахаридов, серы и различных кристаллов. Для выявления этих включений, которые сильно преломляют свет, применяется несколько методов.

Включения волютина хорошо выражены у *Spirillum volutans*, *Bacillus subtilis*, а также у возбудителей сибирской язвы и дифтерии. Гранулы волютина имеют относительно крупные размеры, окрашиваются различными красителями, изменяя цвет последних. Например, при окрашивании метиленовым синим волютин окрашивается в ярко-красный цвет. Такое явление получило название **метахромазии**. Гранулы волютина представлены полифосфатами – запасующимся веществом, которое служит источником фосфатных групп.

**Окраска гранул волютина по Нейссеру. Техника:** 1. На фиксированный мазок наносят 2 – 3 капли раствора метиленового синего по Нейссеру и окрашивают в течение 1 – 2 мин.

2. Краситель сливают, препарат промывают водой.

3. Мазок обрабатывают раствором Люголя в течение 20 – 30 с.

4. Не промывая препарат водой, мазок дополнительно окрашивают 2 – 3 мин 2 % раствором везувина.

5. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют, используя иммерсионную систему. **Цитоплазма окрашивается в желтый цвет, а гранулы волютина – в темно-синий.**

### **Подвижность бактерий**

Поступательное движение бактерий за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя в большинстве случаев светлопольный микроскоп. Наиболее эффективно наблюдение за подвижностью в темнопольном микроскопе. Чтобы убедиться, что жгутики действительно присущи данным микроорганизмам, а также определить их расположение (полярное, перитрихиальное, латеральное), требуются методы с применением окрашивания.

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

**Техника:** 1. Выращенные на скошенном агаре бактерии, осторожно ресуспендируют в пептонной воде. Бактериальной петлей суспензию наносят на предметное стекло и высушивают на воздухе.

2. Восковым стеклогграфом очерчивают вокруг бактериальной пленки прямоугольник.

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

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

5. Препарат микроскопируют с иммерсионной системой. **Клетки бактерий окрашиваются в красный цвет, жгутики принимают вид толстых нитей, отходящих от клетки.**

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

### *Задание*

1. Приготовить окрашенный препарат спорообразующих бактерий и промикроскопировать его.

2. Провести окраску капсулообразующих бактерий.

3. Приготовить окрашенный препарат волютиновых гранул и промикроскопировать его.

4. Определить подвижность бактерий методом укола в столбик 0,3 % питательного агара.

5. Используя полученные результаты и данные литературы, заполнить табл. 2.



Таблица 2

**Характеристика морфологических и тинкториальных особенностей микроорганизмов**

Вид микроорганизма	Окраска по Граму	Кислотоустойчивость	Наличие			Подвижность	Форма и расположение клеток
			эндоспор	капсул	Запасных веществ		
<i>Escherichia coli</i>							
<i>Staphylococcus aureus</i>							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							
<i>Erwinia carotovora</i>							
<i>Bacillus subtilis</i>							
<i>Sarcina lutea</i>							
<i>Mycobacterium rubrum</i>							
<i>Streptococcus lactis</i>							
<i>Bacillus thuringiensis</i>							
<i>Lactobacillus lactis</i>							
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>							
<i>Rhizobium meliloti</i>							
<i>Azotobacter vinelandii</i>							
<i>Saccharomyces cerevisia</i>							

## 8. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

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

копительной культуры; 2) выделение чистой культуры; 3) определение чистоты выделенной культуры.

### **1. Получение накопительной культуры**

Выделение чистой культуры будет успешным, если данный микроорганизм присутствует в популяции в высокой концентрации. Накопление представляет собой основной этап процесса выделения, который позволяет выделить чистые культуры. Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма за счет создания благоприятных условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции. Также накопление дает возможность оценить воздействие различных факторов окружающей среды на смешанную популяцию микроорганизмов, благодаря чему может происходить отбор клеток, способных утилизировать необычные субстраты или хорошо расти в необычных условиях.

**К физическим методам**, которые могут быть использованы при получении накопительной культуры, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение и др. Можно использовать также и особенности некоторых других физических свойств данного микроорганизма, например, его размеры, подвижность, что позволяет отделять данный микроорганизм от других членов популяции. В качестве примеров можно привести следующие.

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

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

**Инкубация при низкой температуре для получения культур психрофильных бактерий.** Поскольку низкая температура способствует задержке роста многих бактерий, на первом этапе проводят инкубирование при температурах 0 – 5 °С. Чашки с образцами инкубируют при температуре ниже 5 °С в течение 14 – 24 дней.

**При использовании химических методов применяют токсические вещества, которые убивают или подавляют рост оставшейся части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм.** Кроме того, эти вещества могут быть источниками питания, используемыми преимущественно отдельными бактериями в смешанной популяции. Примерами использования химических методов для выделения микроорганизмов являются следующие.

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

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

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

**Целлюлоза как субстрат для цитофаг.** Для получения накопительных культур цитофаг, разлагающих целлюлозу, на поверхность основного минерального агара помещают кусочки фильтровальной бумаги. На бумагу кладут частицы почвы или растительного материала и инкубируют чашки при комнатной температуре. Следят за образо-

ванием вокруг частиц желтой, оранжевой или розовой окраски, а также за процессом лизиса бумаги.

**Бактериальные клетки как субстрат для миксобактерий.** Некоторые виды миксобактерий способны с помощью литических ферментов лизировать клетки других бактерий и использовать высвобождающиеся при этом вещества для своего роста. Бактериальные клетки, используемые в качестве субстрата (например, *Enterobacteriaceae*), используют в виде густой суспензии, которую наносят мазком на поверхность водно-агаровой среды. На один конец мазка помещают 2 – 3 частицы почвы или кусочки растительного материала. Через 2 – 5 дней исследуют чашки для анализа растворения бактериального мазка вокруг добавленных частиц. При обнаружении по его краям желтых, оранжевых или розовых плодовых тел их переносят на питательную среду.

**Биологические методы** включают использование специфических хозяев выделяемого микроорганизма, а также преимуществ некоторых свойств патогенных микроорганизмов.

**Получение накопительной культуры патогенных для животных организмов.** Патогенные для животных бактерии можно выделить, заражая восприимчивое животное-хозяин смешанной культурой исследуемого материала, в котором предполагается его присутствие. В инфицированном животном патогенный микроорганизм часто преобладает и обнаруживается в крови и тканях в виде чистой культуры. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется и они гибнут.

Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4 – 6 часов после внутрибрюшинного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *S.pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшинной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

**Бактериальный паразитизм бделловибрионов.** Способность бделловибрионов прикрепляться к различным грамотрицательным бактериям, проникать через их клеточную стенку и размножаться в периплазматическом пространстве с последующим лизисом бактерий используется следующим образом. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования растворенной в воде почвы, пропускают через мембранные фильтры с диаметром до 0,45 мкм. Полученный фильтрат смешивают с суспензией клеток-хозяев (представи-

тели *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*). В составе полужидкой питательной среды, смесь наслаивают на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. После инкубирования в течение 18 – 24 часов проверяют появление зон лизиса. Области лизиса, образованные бделловибрионами (в отличие от бактериофагов), появляются через 2 – 3 суток. Образующиеся зоны лизиса вырезают из агара и наслаивают на газон чувствительной культуры.

**Симбиоз растений с *Rhizobium*.** Клубеньки, образуемые на корнях бобовых растений представляют собой природную накопительную культуру симбиотических азотфиксирующих бактерий. Корни бобовых растений, содержащие клубеньки, промывают и отделяют часть корня с клубеньками. После поверхностной стерилизации (используя сулему, этанол) корень помещают в воду, раздавливают пинцетом в одной чашке Петри, 1 – 2 петли такой суспензии переносят в следующую чашку и т. д. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный агар с маннитом. После застывания агара, чашки инкубируют при оптимальной температуре.

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

## 2. Выделение чистой культуры

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

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

**Рассев шпателем (метод Коха)** производят в следующей последовательности:

а) на поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем;

б) шпатель достают, чашку быстро закрывают и переносят шпатель в чашку № 2, не стерилизуя его. Имитируют распределение культуры по всей поверхности среды, прикасаясь к ее поверхности той же стороной шпателя, которой ранее распределяли пробу;

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

г) засеянные чашки помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре.

Через определенное время чашки достают из термостата и изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдается сплошной рост бактерий, в последующих чашках формируются изолированные колонии.

**Рассев петлей (метод истощающего штриха)** предполагает высев бактериологической петлей из накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рис. 1, *А*). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рис. 1, *Б*). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении *В* (рис. 1), а после очередной стерилизации – в направлении *Г* (рис. 1).

Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах *А* и *Б* вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах *В* и *Г* формируются изолированные колонии.

**Последовательные разведения в твердой среде** – самый простой способ посева по чашкам, который заключается в том, что после инокуляции пробы в пробирку со стерильным расплавленным и охлажденным агаром среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают ей застыть. Для получения хорошо изолированных колоний готовят ряд последовательных десятикратных разведений и по 1 мл проб вносят сразу в чашку, добавляют 15 – 20 мл расплавленной агаризованной среды и смешивают, покачивая чашку. Иногда отдельные колонии оказываются погруженными в агар и извлечь их можно только

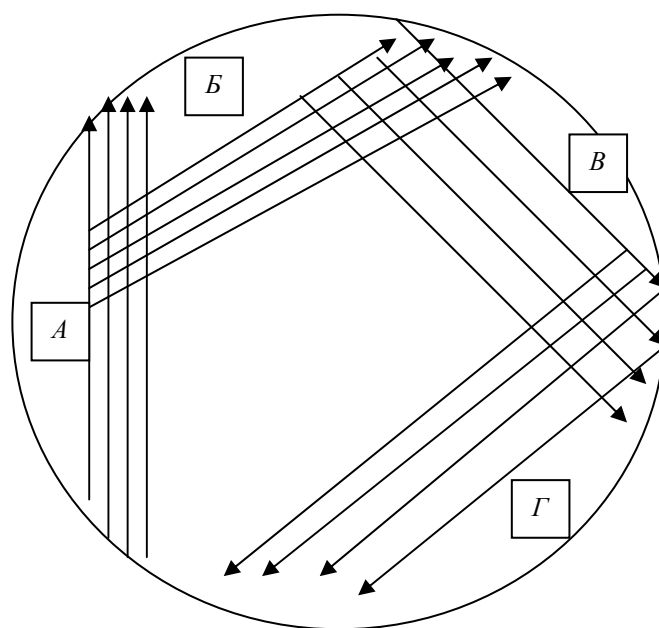


Рис. 1. Схема рассева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

механически. Плохо и то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара.

### 3. Определение чистоты выделенной культуры

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

При описании колоний бактерий определяют их диаметр в миллиметрах, пигментацию, форму (точечная, круглая, волокнистая, неправильная, ризоидная), высоту, профиль (плоский, высокий, выпуклый),

вид края. Край колонии может быть гладким, волнистым, лопастным, зубчатым, волокнистым, складчатым и т. д. Для рассмотрения краев используют микроскоп с малым увеличением. Следует описать также и поверхность колоний, которая бывает гладкой, блестящей, шероховатой, тусклой, неровной, гранулированной матовой, мукоидной, слизистой. Отмечают степень прозрачности колоний (прозрачные, полупрозрачные, непрозрачные) и их консистенцию при проверке иглой: маслянистую, вязкую, сухую. На характеристики колоний могут влиять среда, возраст культуры, условия культивирования.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать путем **микроскопии клеток**. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток, который микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки чистых культур микроорганизмов, как правило, однородны по размеру и окраске по Граму. Однако, следует помнить, что колонии, вырастающие из чистой культуры могут быть гладкие (*S*) и шероховатые (*R*). Кроме того, в чистых культурах многих бактерий могут появляться кокковидные клетки, цисты, споры. Наконец, многие микроорганизмы проявляют грамвариабельность.

Чистоту культуры клеток проверяют также и путем повторного **рассева на селективные среды**, обеспечивающие избирательный рост тех или иных микроорганизмов. Критерием чистоты в этом случае является однородность формирующихся при этом колоний.

#### *Задание*

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

## **8. ПРИНЦИПЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ**

Определение родовой и видовой принадлежности микроорганизмов основывается на результатах морфологических, физиологических и биохимических тестов. Кроме того, для идентификации некоторых видов микроорганизмов исследуют химический состав и строение клеточной стенки, серологические свойства, чувствительность к фагам и другие особенности клеток. В последние годы благодаря достижениям генетики и молекулярной биологии стало возможным приме-



нение новых подходов для идентификации бактерий. Определение возможности генетических скрещиваний, картирование хромосомы микроорганизмов, знание нуклеотидного состава и данные гибридизации нуклеиновых кислот, позволяют судить о филогенетической близости отдельных видов.

В систематике бактерий можно выделить три взаимосвязанных аспекта: первый – это **классификация** – распределение по группам бактерий со сходными фенотипическими или генетическими характеристиками. Второй – **номенклатура** – наименование бактерий в соответствии с международными принципами, правилами и рекомендациями. Третий – **идентификация** – сравнение неизвестных организмов с уже классифицированными бактериями с целью установления их идентичности или наименования неизвестных организмов. Следовательно, систематика стремится расположить множество бактериальных видов в последовательной, ясной и удобной для использования форме.

Основной единицей в систематике является вид. В микробиологии **под видом** обычно понимают типовой штамм и все остальные штаммы, считающиеся достаточно сходными с типовым штаммом. **Типовой штамм** – это штамм, выбранный в качестве постоянного образца того, что подразумевается под данным видом. Культуры типовых штаммов находятся в различных коллекциях (например, американская коллекция типовых культур, коллекция культур Института микробиологии НАН Беларуси, коллекция микроорганизмов Белорусского государственного университета и т. д.). Исторически сложившийся способ характеристики бактерий заключается в описании как можно большего числа фенотипических признаков, основанных на морфологии, структуре, культивировании, питании, биохимии, метаболизме, патогенных и антигенных свойствах и экологии.

Общепринятой схемы классификации бактерий не существует, но наиболее популярной и широко применяемой является схема, приведенная в «Определителе бактерий Берги». Первое издание его вышло в свет в 1923 году, последнее (9-е) – в 1994 году. Описание бактерий приводится по группам (35), в состав которых включены семейства, роды и виды. Патогенные и условно-патогенные для человека виды входят в достаточно небольшое число групп (примерно 20).

При идентификации микроорганизмов следует придерживаться следующих правил:

- быть уверенным в чистоте выделенной культуры;

- постановку тестов по изучению физиолого-биохимических особенностей проводить не менее, чем в двукратной повторности;
- обязательной является постановка заведомо положительного и заведомо отрицательного контроля.

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

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание способности расти на различных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в состав этих сред. Чаще всего учитывают природу источника углерода и энергии, форму азотсодержащих соединений, отношение к кислороду, ферментативную активность при выращивании в присутствии различных субстратов. В настоящее время разработано множество методических подходов к определению того или иного свойства бактерий, различающихся сложностью постановки. В данном руководстве приведены некоторые наиболее простые тесты, используемые для исследования физиолого-биохимических свойств бактерий.

## **1. Выявление окислительно-восстановительных ферментов**

**Выявление каталазы** проводят на предметном стекле в капле 5 % перекиси водорода. Стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую культуру и тщательно перемешивают. При наличии каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

**Выявление оксидазы** также проводят на предметном стекле. Бактериальную культуру снимают с агаризованной среды и вносят в каплю 1 % раствора дигидрохлорида тетраметил-п-фенилендиамина. При положительной реакции в течение 1 мин развивается розово-красная окраска.

**Выявление дегидрогеназ:** в пробирку вносят 1 мл суспензии бактерий, добавляют 0,5 мл 3 % раствора 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ). Смесь помещают в термостат на 30 мин. Если дегидрогеназы восстанавливают ТТХ до формазана, то развивается красное окрашивание трифенилформазана.

## 2. Утилизация микроорганизмами источников углерода

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

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

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

- Основной фон (в %, пептон – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,1);
- Индикатор (бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, феноловый красный);
- Исследуемый углевод или спирт (1 %).

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

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

С помощью бактериологической петли уколом испытываемый микроорганизм засевают в среду Гисса в пробирках. Инкубируют в течение 2 – 4 суток при оптимальной температуре. Рост бактерий в полужидкой среде отмечают в месте укола или на поверхности, также регистрируют образование газа и органических кислот. Полученные резуль-

таты сравнивают с характером роста в контрольной (фоновой) среде, не содержащей испытуемого соединения.

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

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

### **3. Определение продукции гидролитических ферментов**

Многие микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Однако макромолекулы не могут проникать через цитоплазматическую мембрану и не используются микроорганизмами. Первоначально под действием гидролитических ферментов, которые выделяются микроорганизмами, они переходят в низкомолекулярные продукты, которые с помощью специализированных транспортных систем поступают в бактериальные клетки.

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

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

**Разжижение желатины.** С помощью бактериологической петли биомассу исследуемого материала засевают уколом в питательную мясопептонную желатину, приготовленную следующим образом: к жидкой полноценной среде добавляют сухую желатину (12 %), разма-

чивают до набухания, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатины и разливают в пробирки по 5 – 8 мл. Пробирки стерилизуют при 0,5 атм 15 мин. Посев производят после застывания столбиков и микроорганизмы инкубируют при оптимальной температуре 24 – 72 часа.

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

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

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

#### **4. Утилизация микроорганизмами органических азотсодержащих веществ**

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

аммиака (при дезаминировании аминокислот); сероводорода при использовании серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин), индола при утилизации триптофана. Обнаружение подобных продуктов свидетельствует об использовании вышеперечисленных соединений.

**Определение образования индола** может быть проведено несколькими способами. Общий принцип заключается в определении одного из промежуточных продуктов разложения триптофана – индола. После выращивания бактерий в течение 5 суток в жидкой полноценной

среде, содержащей 0,01 % триптофана, на ее поверхность наслаивают 1 – 2 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензальдегид, растворенный в этаноле и соляной кислоте). При положительной реакции образуется красное кольцо на границе раздела со средой.

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

**Определение образования сероводорода** также проводят с использованием индикаторных бумажек, пропитанных раствором уксуснокислого свинца. После соответствующего инкубирования в жидкой полноценной питательной среде выявляют почернение бумаги, которое свидетельствует об образовании сульфида свинца.

**Определение образования аммиака** проводят после культивирования бактерий в жидкой полноценной питательной среде в присутствии индикаторной бумажки, пропитанной реактивом Крупа. Об образовании аммиака свидетельствует покраснение бумаги.

После постановки всех тестов результаты следует занести в табл. 3.

Таблица 3

**Физиолого-биохимические особенности бактерий**

Тест или свойство	Результат
Морфология колоний	
Наличие окислительно-восстановительных ферментов:	
Каталазы	
Оксидазы	
Дегидрогеназы	
Протеолитическая активность	
Амилолитическая активность	
Образование сероводорода	
Образование аммиака	
Образование индола	
Рост на среде Гисса, содержащей:	
Глюкозу	
Лактозу	
Сахарозу	
Мальтозу	
Маннит	

Примечание: «+» или «-» – положительная или отрицательная реакция; «К» – образование кислоты при сбраживании; «Г» - выделение газа при сбраживании.

### *Задание*

1. Отобрать из рассева накопительной культуры 2 – 3 изолированные колонии различной морфологии и описать их свойства.
2. Отсеять на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирке одну из отобранных и описанных колоний.
3. Провести визуальный и микроскопический контроль описанной культуры бактерий.
4. Провести постановку следующих физиолого-биохимических тестов: наличие каталазной, протеолитической, амилалитической, сахаролитической активности; образование сероводорода, аммиака, индола.
5. Результаты экспериментов представить в виде табл. 3.

## **10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ**

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или питательных средах судят по количеству клеток в единице объема. Данная величина носит название **титра клеток (или фаговых частиц)**. Выбор метода для определения числа клеток зависит от цели исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов. Существуют методы, позволяющие определять общее количество микроорганизмов в исследуемом материале или только количество жизнеспособных клеток. С другой стороны, методы подсчета могут быть разделены на методы прямого счета (микроскопические), методы подсчета колоний (методы высева) и методы оптические (нефелометрия, спектрофотометрия и т. д.).

Чтобы определить общее количество микроорганизмов в различных материалах, применяют методы прямого подсчета клеток под микроскопом (в специальных счетных камерах, в фиксированных мазках, на мембранных фильтрах). Такие методы широко применяются в исследованиях микрофлоры воды и почвы. Эффективность такого подсчета, как правило, в 10 – 10000 раз выше, чем при подсчете методом высева, так как многие микроорганизмы не растут на питательных средах и учесть их можно только под микроскопом. Метод дает возможность получить дополнительную информацию о размерах и морфологии изучаемого объекта. Кроме того, прямой подсчет микроорганизмов производится быстрее, более дешев, оборудование для его осуществления имеется в каждой лаборатории.

## 1. Подсчет клеток в окрашенных препаратах (метод Виноградского-Брида)

Преимущество метода заключается в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются и подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

**Техника:** а) на хорошо обезжиренном предметном стекле маркером рисуют прямоугольник строго известной площади (2, 4 или 6 см<sup>2</sup>),

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

в) суспензию равномерно распределяют петлей по всей площади прямоугольника,

г) препарат высушивают на воздухе и фиксируют 15 мин 96 % этанолом,

д) проводят окрашивание фуксином Циля 1 – 2 мин,

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

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

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

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

где  $M$  – количество клеток в 1 мл;  $A$  – среднее число клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);  $s$  и  $S$  – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) и приготовленного мазка в мкм<sup>2</sup> соответственно;  $V$  – объем нанесенной на стекло суспензии в мл;  $n$  – разведение исследуемого материала.



## 2. Подсчет клеток на мембранных фильтрах

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

С помощью мембранного фильтрования могут быть подсчитаны как жизнеспособные клетки микроорганизмов, так и определено общее количество клеток. Начальным этапом данной работы является приготовление фильтров, прибора для фильтрования и собственно фильтрования.

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

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

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

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

Количество клеток микроорганизмов подсчитывают, используя иммерсионный объектив  $\times 90$  в квадратах окулярной сетки или в поле

зрения микроскопа. Правила подсчета аналогичны тем, которых придерживаются для метода Виноградского–Брида. По следующей формуле определяют количество клеток в 1 мл исследуемого материала:

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

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

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

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

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

Мембранный фильтр с бактериями помещают в чашку Петри на фильтровальную бумагу, насыщенную 0,05 % раствором акридинового оранжевого на фосфатном буфере (рН 6,0). Окрашивание проводят 15 – 20 мин. Фильтр промывают, последовательно перенося в чашки Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой. После высушивания готовят препарат для микроскопирования: на предметное стекло наносят нелюминесцирующее вазелиновое масло и помещают на него фильтр так, чтобы бактерии были сверху. На поверхность фильтра наносят еще каплю масла и покрывают тонким покровным стеклом. Препарат микроскопируют в люминесцентном микроскопе со светофильтрами СЗС-14, БС-8 или ФС-1. Подсчитывают живые и мертвые клетки в 20 случайно выбранных полях зрения и по формуле подсчитывают количество клеток в 1 мл исследуемого материала, используя формулу, приведенную в методике для подсчета клеток на мембранных фильтрах.

### **3. Определение количества микробных клеток нефелометрическим методом**

Этот метод широко применяется в микробиологических исследованиях, так как позволяет достаточно точно и сравнительно быстро определить количество клеток в культуральной среде. В основе метода лежит измерение количества света, рассеянного взвесью клеток. Микроорганизмы в большинстве случаев не окрашены и почти прозрачны, поэтому суспензии клеток в видимой области спектра поглощают свет незначительно. Уменьшение интенсивности света после его прохождения через взвесь клеток связано, главным образом, с его рассеиванием. В определенных пределах рассеивание света клетками пропорционально их численности. Следует помнить, что количество рассеянного света пропорционально отношению размера частицы к длине волны падающего света. Поэтому при постоянной длине волны па-

дающего света, светорассеяние зависит от размеров клетки и будет тем большим, чем крупнее клетки и измерение светорассеяния целесообразно для тех культур микроорганизмов, развитие которых вызывает равномерное помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клетки, образованием мицелия, пленок и других скоплений.

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

Количество клеток определяют по калибровочной кривой, отображающей зависимость между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема исследуемой взвеси. Для построения калибровочной кривой поступают следующим образом. Измеряют величину светорассеяния взвеси с различным содержанием клеток и в каждой из них одним из доступных способов подсчитывают количество клеток в единице объема. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на осях: абсцисс – показания нефелометра, ординат – количество клеток, содержащихся в 1 мл. Калибровочные кривые индивидуальны для каждой культуры; для определенных условий выращивания культуры (состав среды, температура, аэрация и т. д.).

## **5. Определение количества жизнеспособных клеток путем посева на питательные среды (чашечный метод Коха)**

Сущность метода подсчета количества клеток путем посева заключается в посеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на агаризованную питательную среду в чашках Петри и подсчете формирующихся колоний, принимая во внимание, что каждая колония – потомство одной жизнеспособной клетки. Существует много вариантов метода.

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

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

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

Подсчет выросших колоний осуществляют обычно через сутки для большинства бактериальных клеток, через 5 – 7 суток для грибов и дрожжей, а колонии актиномицетов учитывают через 7 – 14 суток инкубирования.

При расчете количества клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии суммируют результаты параллельных высевок из одного и того же разведения и определяют среднее количество колоний для данного разведения. Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на агаризованной питательной среде сформировалось от 30 до 300 колоний. Нижний предел устанавливается из соображений статистической достоверности, а верхний – из-за опасности сли-

ния индивидуальных колоний. Полученные данные подставляют в формулу:

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

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

**Метод посева в агаризованную среду** осуществляют путем внесения в стерильную чашку Петри суспензии микроорганизмов из соответствующего разведения с последующим заливанием расплавленной и охлажденной до  $45^{\circ}$  агаризованной средой. Содержимое чашки перемешивают и дают среде застыть.

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

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

#### *Задание*

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

## 11. ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Факторы внешней среды, действующие на микроорганизмы, подразделяют на физические и химические. Их эффект может быть как стимулирующим рост, так и угнетающим его. Например, химические вещества, используемые клеткой для поддержания жизнедеятельности; определенная обеспечивающая рост температура и т. д. Химические вещества или факторы физической природы, полностью или частично угнетающие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к **бактериостатическим**. **Бактерицидные** факторы вызывают гибель микроорганизмов. Характер действия (бактерицидный или бактериостатический) зависит от концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма.

Химические соединения по характеру действия на клетку могут быть разделены на:

1) повреждающие поверхностные структуры клетки и нарушающие проницаемость цитоплазматической мембраны (фенолы, крезолы, спирты, нейтральные мыла, поверхностноактивные вещества, некоторые антибиотики); 2) повреждающие ферменты и вызывающие нарушения обмена веществ (ионы тяжелых металлов, спирты, активные окислители); 3) нарушающие синтез клеточных компонентов (некоторые антибиотики, антиметаболиты).

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

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

### 1. Изучение действия УФ-света на бактерии

Среди разнообразных видов излучения, применяемых в качестве инактивирующих и мутагенных агентов, наиболее часто используются ультрафиолетовые и ионизирующие лучи, различающиеся между собой длиной волны. В диапазоне от 4000 до 10 Å говорят об ультрафиолетовых лучах, а в диапазоне от 10 до 0,1 Å – об ионизирующем

излучении. УФ-свет и ионизирующее излучение поглощаются ДНК клетки, в которой они вызывают различные нарушения. Ионизирующие излучения индуцируют в молекулах ДНК одно- и двунитевые разрывы углеводно-фосфатных цепей и изменения азотистых оснований. Основными фотопродуктами в ДНК после действия УФ-лучей являются циклобутановые димеры тиминовых оснований, располагающиеся в одной нити. Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, при которой отмечается максимум поглощения УФ-лучей молекулами ДНК.

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

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

1. При оценке большое значение имеет плотность (концентрация) изучаемой бактериальной взвеси. УФ-лучи интенсивно поглощаются бактериальной клеткой, а при высокой концентрации клетки могут экранировать друг друга. Последнее обстоятельство не играет существенной роли при концентрациях взвеси, не превышающих  $10^8$  кл/мл. При необходимости использования густой взвеси во время облучения ее постоянно необходимо перемешивать. Бактериальную суспензию следует распределять тонким слоем, поскольку УФ-лучи характеризуются низкой проникающей способностью, в силу чего клетки, располагающиеся более глубоко, не подвергаются их воздействию.

2. Выживаемость клеток зависит от состава среды, используемой для их суспендирования. Лучше проводить облучение в буферных растворах. Жидкая полноценная питательная среда поглощает УФ-



лучи интенсивнее, чем буферные растворы, поэтому получаемая клетками доза облучения уменьшается. В то же время при облучении в жидкой полноценной питательной среде могут образовываться токсические продукты, увеличивающие летальный эффект УФ-лучей, что затрудняет интерпретацию результатов.

3. Летальный эффект УФ-лучей зависит также от физиологического состояния клеток, прежде всего от возраста культуры. Клетки более чувствительны к действию УФ-лучей в экспоненциальной стадии роста.

Для эксперимента необходима культура бактерий, находящихся в экспоненциальной стадии роста. Для ее получения бактериальные клетки накануне занятия засевают в жидкую полноценную питательную среду и инкубируют в течение 18 часов при 28 °С. Выросшую культуру разводят в 10 раз жидкой полноценной питательной средой и инкубируют еще 2 часа при аэрировании на специальной качалке. Затем бактериальные клетки отмывают от питательной среды путем центрифугирования и ресуспендируют в исходном объеме фосфатного буфера или физиологического раствора. Для постановки эксперимента необходимо 30 мл такой суспензии.

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

Для определения количества жизнеспособных клеток отбирают пробы по 0,5 мл из контрольной и 5-ти облученных взвесей и после серии десятикратных разведений в физиологическом растворе из последних разведений проводят высевы на поверхность агаризованной полноценной питательной среды в двух чашках Петри.

Чашки помещают в термостат при оптимальной для роста температуре до появления колоний. Количество колоний подсчитывают, определяют титр клеток и выживаемость облученных УФ-светом клеток в процентах от контроля. Данные вносят в табл. 4.

Выживаемость клеток, облученных УФ-лучами, выражают графически. По оси абсцисс откладывают время облучения, по оси ординат – выживаемость в процентах (рис. 2).

Таблица 4

**Действие УФ-света на бактериальные клетки**

Вариант опыта	Время облучения, с	Разведение	Количество		Выживаемость, %
			колоний	клеток/мл	
контроль	0	$10^{-5}$			100
1	30	$10^{-5}$			
2	60	$10^{-4}$			
3	90	$10^{-3}$			
4	120	$10^{-3}$			
5	240	$10^{-2}$			

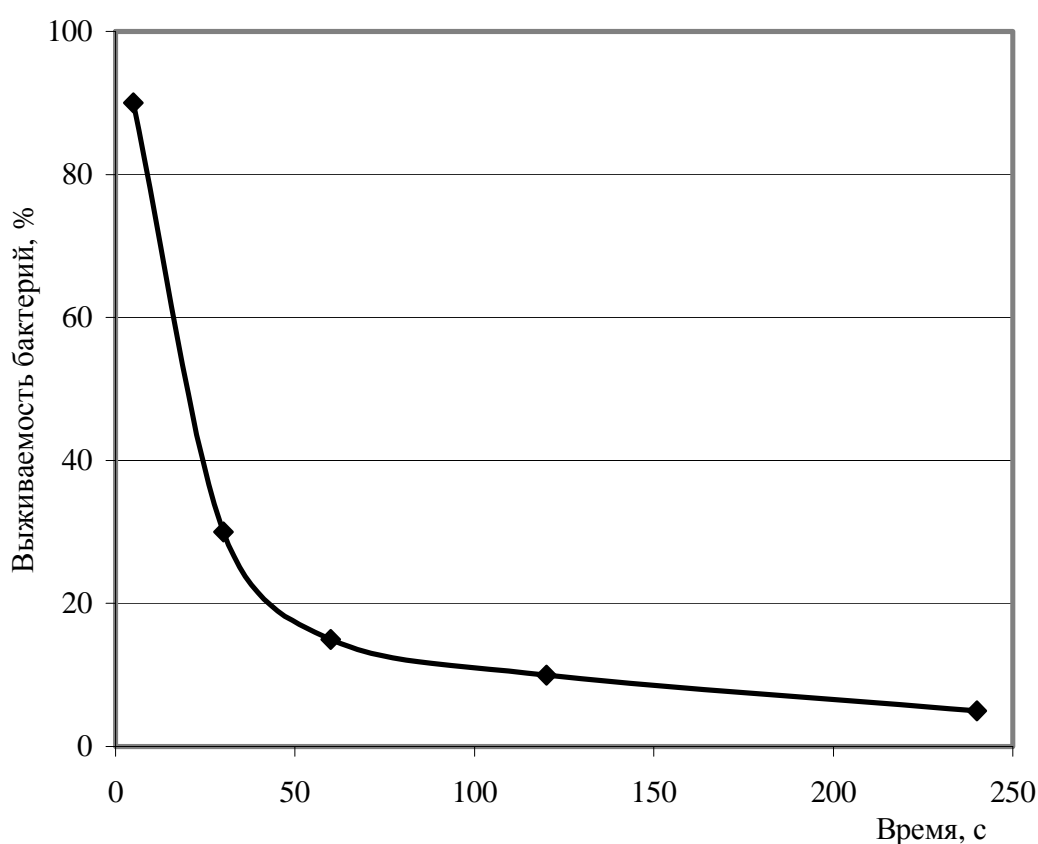


Рис. 2. Инактивирующее действие УФ-света на клетки

**2. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам**

Существует несколько методов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Наибольшее распространение получил метод серийных разведений антибиотика в жидкой или агаризованной питательной среде и метод бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков.

Определение чувствительности к антибиотикам **методом бумажных дисков** основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Концентрация антибиотиков в дисках подобрана таким образом, чтобы диаметры зон задержки роста стандартных тест-организмов были 28 – 32 мм.

Бактерии исследуемого штамма (0,1 мл суспензии, находящейся в стационарной стадии роста) высевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри и распределяют шпателем. Затем стерильным пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков, выпускаемые промышленностью. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для роста исследуемых бактерий. Если бактерии чувствительны к данному соединению, то вокруг дисков образуется зона задержки роста. Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику (рис.3).

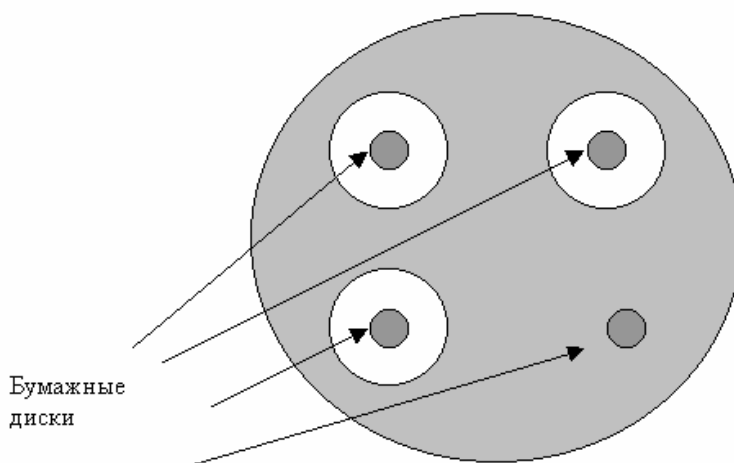


Рис. 3. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков (затемненная часть – рост бактерий, светлая зона – отсутствие видимого роста)

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

Для постановки эксперимента необходимы:

1. Питательные среды, обеспечивающие оптимальные условия роста исследуемого микроорганизма и не содержащие веществ, инактивирующих антибиотик;
2. Растворы антибиотиков;
3. Культуры микроорганизмов, исследуемые на чувствительность к антибиотикам.

Работу начинают с приготовления растворов антибиотика. Для этого в ряд стерильных пробирок наливают по 2 мл жидкой полноценной питательной среды. В первую пробирку вносят 2 мл исходного раствора антибиотика (концентрация препарата – 500, 1000 мкг/мл) и тщательно перемешивают смесь. После этого 2 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую, повторяя перемешивание, далее 2 мл из второй пробирки переносят в третью и т. д. Из предпоследней пробирки 2 мл раствора антибиотика удаляют. При таком способе разведения в каждой пробирке будет содержаться по 2 мл раствора антибиотика и в каждой последующей пробирке его концентрация будет в два раза меньше, чем в предыдущей. Среда в последней пробирке раствора антибиотика не содержит и является контрольной для роста культуры.

После приготовления разведений во все пробирки вносят по 0,1 мл взвеси клеток с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось  $10^5 - 10^4$  клеток (рис. 4).

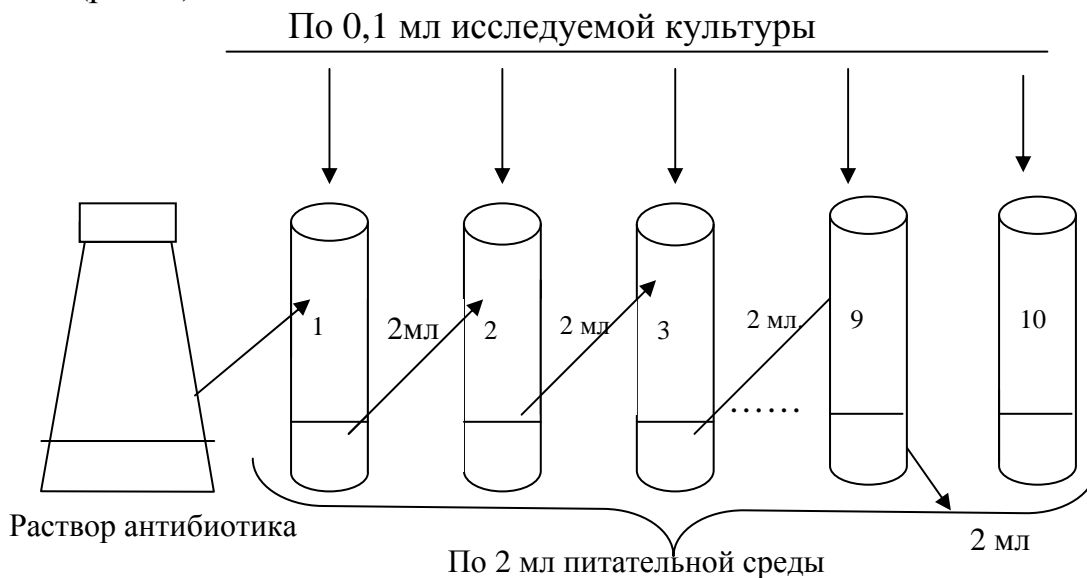


Рис. 4. Схема эксперимента по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотику методом серийных разведений препарата в жидкой питательной среде

Пробирки энергично перемешивают и помещают на 18 – 20 часов для выращивания при оптимальной температуре. Учет результатов проводят двояко: вначале просматривают пробирки, чтобы по помутнению среды определить наличие роста микроорганизмов. Помутнение среды указывает на наличие высокой численности бактерий (более  $10^7$  кл/мл). Среда в пробирках, в которых антибиотик находится в концентрациях, достаточных для подавления роста микроорганизмов, остается прозрачной. Наименьшая концентрация антибиотика, при которой размножение микроорганизмов уже не происходит, а содержимое пробирок остается прозрачным, соответствует наименьшей ингибирующей концентрации данного антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма и рассматривается как бактериостатическая, что означает задержку роста бактерий, но не наличие их гибели. Для определения бактерицидной концентрации исследуемого антибиотика в отношении изучаемого микроорганизма (это значит, концентрации препарата, в которой он вызывает гибель клеток) проводят посев бактериологической петлей из пробирок, содержимое которых не помутнело, на полноценную питательную агаризованную среду. Отсутствие роста свидетельствует, что в данной пробирке микроорганизмы полностью убиты данным антибиотиком.

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

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

### Задание

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

## 12. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ

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

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

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

Примером симбиоза являются взаимоотношения цианобактерий и микроскопических грибов в лишайнике. Оба партнера лишайника способны к самостоятельному существованию, но в условиях чрезвычайного дефицита питательных веществ и крайних пределов увлажнения

ния и высыхания, их ассоциация в лишайнике дает взаимный выигрыш. Польза, получаемая грибом от симбиоза в таких условиях, очевидна: он зависит от цианобактерии, как от источника органических питательных веществ. Кроме того, цианобактерии способны фиксировать атмосферный азот, который также используется грибом. Вклад гриба в ассоциацию состоит в том, что он облегчает поглощение воды и минеральных веществ, а также защищает фотосинтезирующего партнера от высыхания и избыточной интенсивности света.

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

Разновидностью метабиоза является **сателлитизм**, для которого характерно, что одни микроорганизмы выделяют в среду ростовые вещества (аминокислоты, витамины и др.), стимулирующие развитие другого микроорганизма. При **синергизме** у членов микробной ассоциации взаимно повышается физиологическая активность за счет выделения продуктов, стимулирующих их развитие.

Помимо благоприятных взаимоотношений между микроорганизмами наблюдаются и такие, при которых один вид микроорганизмов полностью или частично подавляет рост и развитие других видов, т. е. между ними при их развитии наблюдается антагонизм. Причины, приводящие к антагонизму, разнообразны:

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

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

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

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

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

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

Наиболее существенной формой конкурентных взаимоотношений, имеющей важное практическое использование, является образование микробами-продуцентами специфических продуктов обмена, угне-



тающих или полностью подавляющих развитие микроорганизмов других видов.

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

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

При использовании **метода перпендикулярных штрихов** на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. Посев делают по диаметру чашки, которую затем помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста. Продолжительность культивирования определяется скоростью роста антагониста. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевают штрихами тест-культуры, начиная от краев чашки. Чашки помещают в термостат на 48 часов. Если изучаемый микроорганизм-антагонист образует диффундирующее в среду вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха (рис. 5).

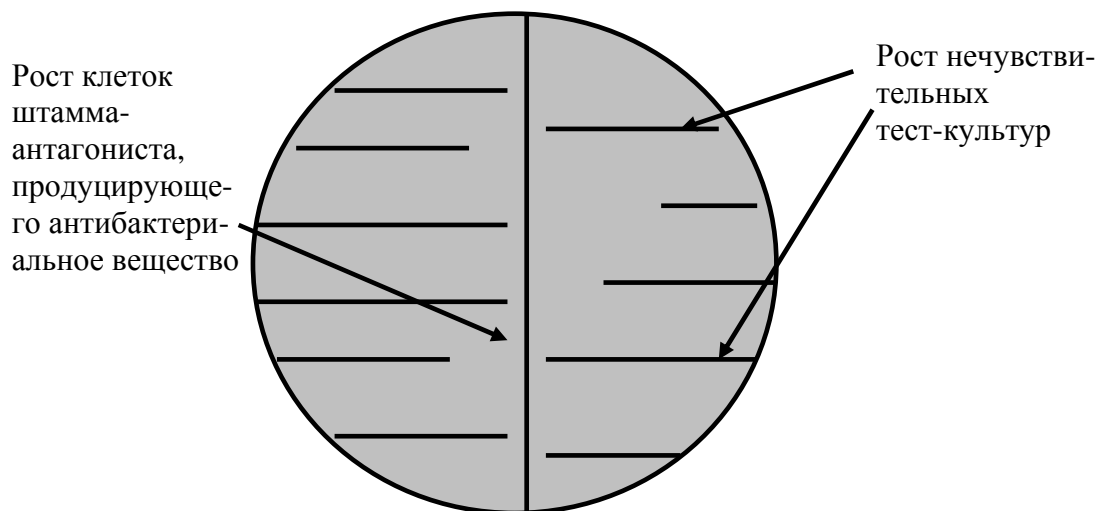


Рис. 5. Определение антагонистической активности микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов

Этот метод имеет недостаток: микроб-антагонист и тест-культуры выращиваются на одной среде, хотя она не всегда может быть благоприятна и для развития продуцента и образования им антибиотического вещества, и для роста испытуемых культур. Однако использование метода позволяет одновременно проверить чувствительность большого числа культур к известному антагонисту.

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

Исучаемый на антагонистическую активность микроорганизм засевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе его роста сформировался «сплошной газон». После того, как клетки микроорганизма хорошо вырастут, стерильным пробочным сверлом (или пробиркой) вырезают агаровые блоки, которые переносят на предварительно засеянную тест-культурой поверхность среды в другой чашке Петри. Тест-культура засеивается шпателем, а агаровые блоки накладывают растом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к агаровой пластинке. На одной чашке Петри можно разместить 4 – 5 агаровых блоков с различными продуцентами антибиотических веществ. Чашки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для роста тест-культуры. В случае чувствительности последних к анти-

бактериальному веществу продуцента вокруг агаровых блоков образуются зоны отсутствия роста. Чем больше выделяется антибактериального вещества, чем оно активнее и лучше диффундирует в среде, тем больше диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антибиотическому веществу данного продуцента клетки растут на всей поверхности среды (рис. 6).

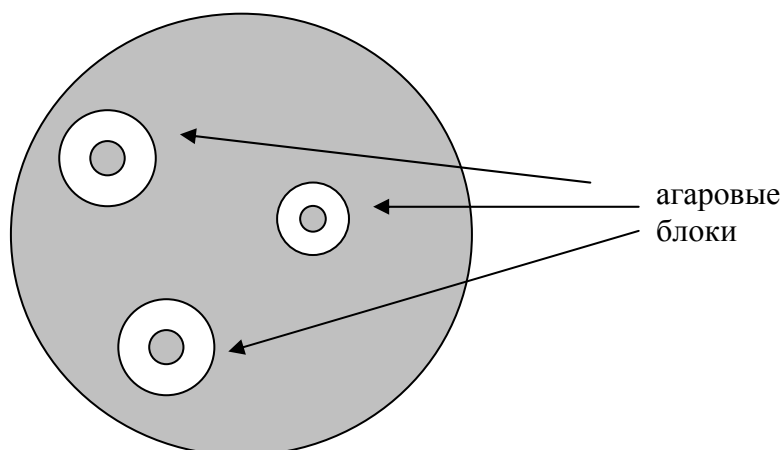


Рис. 6. Определение антагонистической активности методом агаровых блоков

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

**Изучение антагонистических взаимоотношений при совместном культивировании в жидкой питательной среде** основано на подсчете числа жизнеспособных особей после совместного культивирования двух штаммов микроорганизмов, клетки которых при этом должны различаться друг от друга легко определяемыми признаками

(пигментация, сбраживание углеводов, устойчивость к антибиотикам, ауксотрофность и др.). Кроме того, необходимо, чтобы оба микроорганизма одинаково хорошо росли при используемых условиях (температуре, составе среды и т. д.).

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

#### *Задание*

1. Изучить микробный антагонизм методом агаровых блоков.
2. Изучить продукцию бактериоцинов методом отсроченного антагонизма.

### **13. СПОСОБЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У БАКТЕРИЙ**

Генетическая информация в бактериальных клетках заключена в ДНК хромосомы (или хромосом), состоящей из нескольких тысяч генов, а также во внехромосомных генетических элементах (структурах), называемых плазмидами.

В настоящее время описаны четыре способа генетического обмена у бактерий: трансформация (1928), конъюгация (1946), трансдукция (1952) и слияние протопластов (1976). **Трансформация** – процесс передачи генетической информации от донора к реципиенту в виде изолированной внеклеточной ДНК. Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия генетических признаков донора, называется **трансформантом**. При **трансдукции** генетическая информация от донорских к реципиентным клеткам переносится с помощью бактериофагов. Реципиентная клетка, которая таким путем приобретает признаки донора, называется **трансдуктантом**. **Конъюгация** – процесс переноса ДНК от донорной к реципиентной клетке, осуществляющийся в результате прямого контакта между клетками бактерий. Реципиент, который при этом получает такой генетический материал, назы-

вается **трансконъюгантом**. При слиянии протопластов (сферопластов) обмен генетической информацией осуществляется на уровне полных геномов двух родительских форм, индуцированных к слиянию. Получаемая после реверсии клетка носит название **гибридной**.

Способы генетического обмена, наряду с процессами мутирования генов, играют важную роль и обуславливают генетическую изменчивость, поставляющую материал для эволюции. Эти процессы также важны и для понимания биохимических и генетических механизмов функционирования бактерий, установления принципов строения и регуляции генов, а также расшифровки сложных процессов синтеза макромолекул, роста и деления клеток.

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

### **Выделение мутантов бактерий**

Мутации и индукция новых мутаций мутагенами представляют собой ценный инструмент в генетических и биохимических исследованиях. Во-первых, изменения, которые вызывает мутация в определенном гене, позволяют не только его идентифицировать, но и точно указать его место в хромосоме с помощью методов генетического картирования. Во-вторых, анализ мутантных штаммов, у которых нарушены различные этапы сложной цепи биохимических процессов, может вскрыть детали организации генетического и биохимического аппаратов. В-третьих, знание механизмов действия различных мутагенов может помочь в установлении корреляции между мутагенным и канцерогенным действием множества факторов окружающей среды (химические агенты, радиоактивное излучение и др.).

Для того, чтобы использовать мутагенез в генетических исследованиях, необходимо согласованно провести ряд последовательных этапов работы:

1. Определить, какой тип мутанта соответствует цели исследования (делеционный, с точковой мутацией, с заменой пар оснований, условно-летальный и т. д.) (табл. 4).

Таблица 4

## Структурно-функциональная характеристика мутаций у бактерий

Тип мутаций	Природа изменений в ДНК	Тип мутирующих генов	Влияние на функцию гена	Обратимость мутации	Супрессивность тРНК
Транзиции	Простая замена оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	да	да
Трансверсии	Сложная замена оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	да	да
Миссенс	Замены оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	да	да
Нонсенс	Замены оснований	Гены, кодирующие белок	Полная потеря функции	да	да
Мутации других типов	Замены оснований	Регуляторные области, гены для тРНК и рРНК	Различное	да	нет
Делеции	Потеря участка в ДНК	Любые	Полная потеря функции	нет	нет
Вставки	Включение генома фага или Tn	Любые	Полная потеря функции	да	нет
Со сдвигом рамки считывания	Вставки или делеции	Гены, кодирующие белок	Полная потеря функции	да	да

2. Выбрать наиболее подходящий мутаген для индукции мутаций, что определяется двумя факторами: типом мутации, которую хотят получить и относительной эффективностью мутагена в отношении желаемой мутации. Например, этилметансульфонат (ЭМС), N-метил-N<sup>1</sup>-нитро-N-нитрозогуанидин (нитрозогуанидин, НГ), гидроксилламин и азотистая кислота вызывают преимущественно простую замену пар оснований GC на AT. Характер действия некоторых наиболее часто используемых мутагенов приведен в табл. 5.

Таблица 5

## Свойства некоторых часто используемых мутагенов

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

3. Создать условия для выражения (экспрессии) новой мутации. Это обусловлено тем, что при практически любых условиях роста бактериальная клетка содержит от полутора до двух копий хромосом. В связи с этим целесообразно дать культуре клеток, обработанной мутагеном, расти в течение определенного времени и тем самым исключить возможность присутствия хромосомы, содержащей мутацию, и исходной. Длительность периода роста зависит как от времени генерации бактерий, так и особенностей роста (цепочками, гроздьями, одиночными клетками).

4. Провести обогащение по желаемому мутанту для повышения вероятности его выделения. Обычно возникновение мутаций (даже при использовании сильных мутагенов) – относительно редкое событие ( $10^{-6} - 10^{-7}$ ). Особенно трудно выделить мутантные клетки, если применяются непрямые методы селекции. В самой распространенной методике обогащения используется антибиотик пенициллин. Суть данного приема сводится к следующему. При выращивании культуры, содержащей как мутировавшие, так и немутантные клетки в синтетической среде, не обеспечивающей рост мутантов, пенициллин вызы-

вает избирательную гибель только активно делящихся клеток (или клеток бактерий «дикого типа»), нарушая у них процесс синтеза клеточной стенки. В оптимальных условиях можно достичь 1000-кратного обогащения мутантами по отношению к немутантам (см. далее).

5. Обнаружить новый мутант соответствующими прямыми или непрямими методами отбора: прямым или непрямим (см. далее).

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

### **Получение мутантов, устойчивых к антибиотикам (прямой отбор)**

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

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

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



## Получение ауксотрофных мутантов (непрямой отбор)

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

Для получения ауксотрофных мутантов проводят следующее:

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

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

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

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

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

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

- бактерии, выращенные в полноценной среде, перед обработкой пенициллином необходимо отмыть после центрифугирования минимальной средой и выдержать в ней в течение времени, достаточного для 4 – 5 генераций. Это необходимо для истощения эндогенных метаболитов, имеющих в ауксотрофных клетках, чтобы предотвратить их деление в среде с антибиотиком.

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

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

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

8. Определяют потребности в факторах роста у выделенных ауксотрофных мутантов. Для этого перепечатаывают клоны на минимальный агар с добавками аминокислот в различных комбинациях (табл. 6). Определяют, при наличии каких наборов факторов роста растет данный мутант. Эти данные дают возможность сделать вывод о природе нарушения, вызванного мутацией.

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

Таблица 6

**Комбинации добавок к минимальной среде для определения потребностей в факторах роста**

Номер набора	1	2	3	4	5
6	Аденин	Гуанин	Цистеин	Метионин	Витамин В <sub>1</sub>
7	Гистидин	Лейцин	Изолейцин	Валин	Лизин
8	Фенилаланин	Тирозин	Триптофан	Треонин	Пролин
9	Глутаминовая к-та	Серин	Аланин	Аспарагиновая к-та	Аргинин

**Примечание:** все вещества добавляют до конечной концентрации 20 мкг/мл, В<sub>1</sub> – 4 мкг/мл

## Передача хромосомных маркеров при конъюгации бактерий (техника скрещивания бактерий)

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

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

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

- 1) минимальная глюкозо-солевая среда + триптофан + гистидин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор pro<sup>+</sup> str-r-рекомбинантов);
- 2) минимальная глюкозо-солевая среда + триптофан + пролин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор his<sup>+</sup> str-r-рекомбинантов);
- 3) минимальная глюкозо-солевая среда + пролин + гистидин + стрептомицин (200 мкг/мл) (отбор trp<sup>+</sup> str-r-рекомбинантов).

Кроме того, на эти же среды высевают клетки донорных и реципиентных бактерий, чтобы убедиться в их неспособности расти на селективных средах (рис. 7).

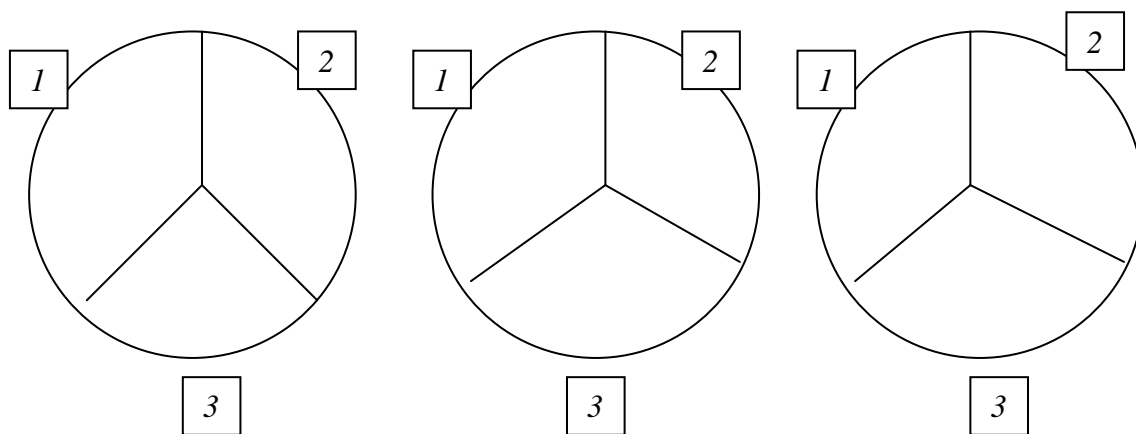


Рис. 7. Схема посева родительских и рекомбинантных клеток (конъюгационная смесь) на селективные среды:

- 1 – высев клеток донора;
- 2 – высев клеток реципиента;
- 3 – высев конъюгационной смеси

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

Чашки помещают в термостат на 48 часов, учитывают результаты по наличию роста. Эффективность конъюгационного процесса оценивают по частоте формирования рекомбинантов по определенным маркерам. Частота переноса – это отношение количества полученных рекомбинантных клеток к количеству клеток донора. Для подсчета количества рекомбинантных клеток делают разведения конъюгационной смеси и из соответствующих разведений производят высевы на селективные среды. Количество клеток донора определяют при высеве на среды, не поддерживающие рост клеток реципиента.

#### **Задание**

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

## **14. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ**

### **I. ТЕКУЩИЙ КОНТРОЛЬ УСВОЕНИЯ МАТЕРИАЛА ПО ОСНОВНЫМ РАЗДЕЛАМ КУРСА «МИКРОБИОЛОГИЯ»**

#### **Тема: Анатомия бактериальной клетки**

1. Химический состав строения и функции клеточной стенки бактерий. Отличия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий.
2. Техника и механизм окраски бактерий по методу Грама.
3. Бактериальные протопласты и сферопласты. Методы получения, свойства, использование. L-формы бактерий и их характеристика.
4. Химический состав, организация и функции поверхностных структур бактериальной клетки (капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки).
5. Методы выявления бактериальных капсул.
6. Цитоплазматическая мембрана бактерий. Химическая природа, строение и функции. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембраны и их функции.
7. Цитоплазма бактерий. Химический состав и организация. Внутрицитоплазматические включения, их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции.
8. Выявление резервных веществ бактериальной клетки.
9. Ядерный аппарат бактериальной клетки. Его химическая и структурная организация, функции. Репликация ДНК.
10. Органеллы движения микроорганизмов. Строение и функционирование бактериальных жгутиков. Другие типы движения у бактерий.
11. Методы изучения подвижности бактериальных клеток. Методы выявления бактериальных жгутиков и техника их окраски.
12. Строение, химический состав и особенности бактериальных эндоспор. Цитология и биохимия процесса спорообразования. Практическое значение. Другие покоящиеся формы бактерий.
13. Методы выявления бактериальных эндоспор.
14. Микроскопические методы исследования в микробиологии.
15. Методы прижизненного изучения микроорганизмов.
16. Простые и сложные методы окраски бактериальных клеток и их назначение.

## **Тема: Метаболизм бактерий**

1. Метаболизм бактерий. Виды и основные назначения метаболических реакций, общая характеристика и особенности.
2. Энергетический метаболизм бактериальной клетки. Характеристика типов энергетического метаболизма.
3. Аэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи.
4. Нитратное дыхание. Распространение и роль денитрифицирующих бактерий в природе.
5. Сульфатное дыхание. Биологические особенности, распространение и значение сульфатовосстанавливающих бактерий.
6. Карбонатное дыхание. Биологические особенности, экология и роль в природе метанобразующих бактерий.
7. Спиртовое брожение. Энергетический выход спиртового брожения.
8. Маслянокислое брожение: химизм и практическое использование.
9. Типы молочнокислого брожения. Использование молочнокислых бактерий.
10. Пропионовокислое брожение. Пути образования пропионовой кислоты у прокариот.
11. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение.
12. Биосинтез аминокислот бактериями: основные предшественники и пути биосинтеза.
13. Биосинтез нуклеотидов бактериями.
14. Биосинтез жирных кислот и фосфолипидов бактериями.
15. Питание бактериальной клетки. Химические вещества как питательных субстраты. Физиологические группы питания бактерий.

## **Тема: Генетика бактерий**

1. Изменчивость бактерий. Доказательства мутационной природы изменения наследственных признаков у бактерий. Понятие об адаптации у микроорганизмов.
2. Мутации у бактерий. Классификация мутаций и молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы. Практическое использование мутаций.
3. Общая характеристика способов генетического обмена у бактерий. Практическое использование.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

13. Репарация повреждений ДНК у бактерий.

14. Регуляция биохимической активности бактериальной клетки.

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

16. Механизм функционирования репрессибельных оперонов.

## **II. ИТОГОВОЕ ЗАНЯТИЕ ПО ТЕХНИКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Цель данного занятия заключается в определении способности применить полученные знания и освоенные методические приемы работы с микроорганизмами для характеристики и определения физиолого-биохимических свойств некоторых бактериальных культур без использования дополнительной литературы.

Необходимо:

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

**III. ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ  
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПИСЬМЕННОГО ЭКЗАМЕНА  
(приводится примерный перечень):**

1. Укажите основные свойства бактериоцинов:

1. Представлены белками или белками в комплексе с липополисахаридами.
  2. Представлены углеводами.
  3. Синтез зарепрессирован.
  4. Действуют на близкородственные бактерии.
  5. Взаимодействуют через неспецифическое связывание.
  6. Взаимодействуют через специализированные рецепторы.
- А. 2,3,4,5      В. 1,3,4,6  
Б. 1,3,4,5      Г. 2,3,4,5

2. Укажите основные свойства крупных плазмид:

1. Отвечают за фенотипические признаки бактерий.
  2. Способны к автономной репликации.
  3. Характерен ослабленный контроль репликации.
  4. Совместимы друг с другом в клетках бактерий разных видов.
  5. Стабильно наследуются в бактериях различных родов.
- А. 1,2      Г. 3,4  
Б. 2,4      Д. 4,5  
В. 1,3      Е. 1,4



3. Укажите основные биологические особенности бактерий рода *Pseudomonas*:

1. Грамотрицательные палочки.
2. Осуществляют катаболизм гексоз путём Энтнера-Дудорова.
3. Осуществляют катаболизм гексоз пентозофосфатным путём.
4. Метаболизм бродильный.
5. Имеют полярное расположение жгутиков.

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

4. Какие из перечисленных бактерий относятся к архебактериям ?

1. *Clostridium tetani*.
2. *Erwinia carotovora*.
3. *Thermoplasma acidophilum*.
4. *Halobacterium salinarium*.
5. *Methanothermus fervidus*.
6. *Thiobacillus ferrooxidans*.

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

5. Укажите характерные особенности представителей семейства *Enterobacteriaceae*:

1. Кислотоустойчивые.
2. Хемолитоавтотрофы.
3. Хемоорганогетеротрофы.
4. Факультативные анаэробы.
5. Продуцируют масляную кислоту.
6. Не образуют эндоспор.
7. Грамотрицательные.

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

6. Фермент нитрогеназа катализирует реакции:

- А. Превращения нитритов в нитраты.
- Б. Синтеза глутамина из глутаминовой кислоты.
- В. Активирование молекулярного азота и восстановителя при биологической фиксации молекулярного азота.
- Г. Окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

7. Укажите свойства пурпурных бактерий:

- 1. В клетках содержат бактериохлорофилл а или бактериохлорофилл в.
- 2. В клетках содержат хлорофилл а.
- 3. Фотосинтетические пигменты локализованы в хлоросомах.
- 4. Все элементы фотосинтетического аппарата локализованы в цитоплазматической мембране и её производных.
- 5. В процессе фотосинтеза осуществляется циклический и нециклический транспорт электронов.
- 6. В процессе фотосинтеза осуществляется циклический и обратный транспорт электронов.
  - А. 2,4,6      Г. 2,3,5
  - Б. 1,3,5      Д. 2,4,5
  - В. 1,4,6

8. Возбудителем сифилиса являются бактерии:

- А. *Spirochaeta aurantia*.
- Б. *Bacillus anthracis*.
- В. *Treponema pallidum*.
- Г. *Clavibacter michiganense*.
- Д. *Corynebacterium bovis*.
- Е. *Rickettsia prowazekii*.

9. Брожение смешанного типа у бактерий приводит к образованию всех нижеперечисленных продуктов, кроме:

- А. Ацетата.
- Б. Формиата.
- В. Бутирата.
- Г. Лактата.
- Д. Этанол.

10. Какая аминокислота должна присутствовать в среде для определения способности бактерий к образованию индола ?

- А. Метионин.
- Б. Лизин.
- В. Триптофан.
- Г. Фенилаланин.
- Д. Гистидин.

11. Какие из перечисленных микроорганизмов входят в состав нормальной микрофлоры человека?

1. *Streptococcus faecalis*.
2. *Staphylococcus aureus*.
3. *Bifidobacterium bifidum*.
4. *Bordetella pertussis*.
5. *Candida albicans*.

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

12. Для каких бактерий характерен пентозофосфатный путь окисления гексоз?

- А. Гетероферментативных молочнокислых бактерий.
- Б. Маслянокислых бактерий.
- В. Пропионовокислых бактерий.
- Г. Гомоферментативных молочнокислых бактерий.

13. Аэробные бактерии содержат переносчики электронов или атомов водорода:

1. Менахиноны.
2. Меркаптоэтанолсульфаты.
3. Редуктазы.
4. *FeS*-белки.
5. Сукцинатдегидрогеназы.

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

14. *Hfr*-доноры бактерий образуются:

- А. При эксцизии конъюгативных плазмид из хромосомы.
- Б. В результате гомологичной рекомбинации между *IS*-элементами конъюгативной плазмиды и хромосомы.
- В. При интеграции в хромосому нетрансмиссивных плазмид.
- Г. В результате негомологичной рекомбинации при эксцизии плазмид из хромосомы.

15. Ссдукция – это:

- А. Половой процесс у бактерий.
- Б. Передача конъюгативных плазмид в реципиентные клетки.
- В. Передача хромосомных генов в составе  $F'$  - плазмиды.
- Г. Излечение бактериальных клеток от плазмид.

16. Лизогенные бактерии – это:

- А. Бактерии, в хромосому которых интегрирован половой фактор.
- Б. Бактерии, в которых осуществляется литический цикл.
- В. Бактерии, в хромосому которых интегрирована ДНК фага.
- Г. Бактерии, для которых не характерна фаговая конверсия.

17. Факторами вирулентности фитопатогенных бактерий являются:

- 1. Полигалактуроназы.
- 2. Гемицеллюлазы.
- 3. Метилазы.
- 4. Полисахариды слизистых веществ.
- 5. Гетероауксины.
- 6. Пирокатехины.

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

18. Какие из перечисленных бактерий относятся к эпифитной микрофлоре растений?

- 1. *Bacillus cereus*.
- 2. *Erwinia herbicola*.
- 3. *Clostridium botulinum*.
- 4. *Leuconostoc mesenteroides*.
- 5. *Streptococcus plantarum*.
- 6. *Lactobacillus brevis*.

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

19. Азотистая кислота индуцирует возникновение мутаций за счет того, что:

- А. Внедряется между соседними основаниями в цепи ДНК.
- Б. Алкилирует гуанин в репликативной вилке.
- В. Замещает аминогруппу гидроксильной группой в молекуле аденина.
- Г. Вызывает образование димеров тимина.

20. Сколько в среднем молекул АТФ образуется при сбраживании одной молекулы глюкозы маслянокислыми бактериями?

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

21. Сколько молекул АТФ образуется при окислении одной молекулы ФАДН<sub>2</sub> в дыхательной цепи дрожжей?

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

22. Предшественниками для синтеза пиримидиновых нуклеотидов являются:

- 1. Глутамин.
- 2. 5-фосфорибозил.
- 3. Карбамоилфосфат.
- 4. Эритрозо-4-фосфат.
- 5. Аспартат.

- А. 1,5
- Б. 3,4
- В. 2,4
- Г. 3,5

23. Стеклопосуду можно простерилизовать следующими способами:

- 1. Текучим паром.
- 2. Насыщенным паром под давлением.
- 3. Сухим горячим воздухом.
- 4. Тиндализацией.

- А. 2,4
- Б. 1,4
- В. 1,3
- Г. 2,3

24. Какие из перечисленных типов мутантов можно выделить методами прямого отбора?

1. Ауксотрофные.
2. Устойчивые к антибиотикам.
3. Способные утилизировать нетрадиционные источники углерода или азота.
4. С измененной способностью к сбраживанию углеводов.
5. Температурочувствительные.

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

25. Синхронные бактериальные культуры – это:

- А. Культуры, имеющие постоянный химический состав.
- Б. Культуры, в которых клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла и делятся одновременно.
- В. Культуры, в которых удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции.
- Г. Культуры, в которых постоянное количество клеток.

26. Оператор. Какие из приведенных утверждений об этой генетической единице верны?

1. Оператор – место связывания репрессора.
2. Оператор – место связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы.
3. В генах оператора происходят мутации.
4. Оператор – строго определенная последовательность нуклеотидов.

- |        |         |
|--------|---------|
| А. 1,4 | В. 1,3  |
| Б. 2,3 | Г. 2,4. |

27. Какие из перечисленных видов бактерий не являются гаплоидными ?

1. *Rhodobacter sphaeroides*.
2. *Bacillus subtilis*.
3. *Agrobacterium tumefaciens*.
4. *Pseudomonas cepacia*.
5. *Pseudomonas aeruginosa*.
6. *Escherichia coli*.

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

28. Антибиотик стрептомицин подавляет синтез белка, потому что:

- А. Действует на 50 S- субъединицы рибосом.
- Б. Нарушает функционирование 30 S – субъединиц рибосом.
- В. Нарушает функционирование фактора элонгации.
- Г. Нарушает функционирование растворимых факторов, принимающих участие в биосинтезе белка.

29. В основе круговорота основных биогенных элементов в природе лежит:

- А. Антагонизм.      Г. Метабиоз.
- Б. Синергизм.      Д. Хищничество.
- В. Сателлитизм.

30. Аутоинфекция – это:

- А. Заболевание, вызванное условнопатогенными микроорганизмами.
- Б. Заболевание, вызванное микроорганизмами с ослабленной вирулентностью.
- В. Качественное и количественное нарушение микрофлоры в организме.

#### IV. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

##### Возбудители заболеваний у человека и животных:

1. *Corynebacterium diphtheriae* – дифтерия.
2. *Mycobacterium tuberculosis* – туберкулез человека.
3. *Mycobacterium leprae* – проказа.
4. *Mycobacterium bovis* – туберкулез крупного рогатого скота.
5. *Treponema pallidum* – сифилис.
6. *Clostridium tetani* – столбняк.
7. *Clostridium botulinum* – ботулизм.
8. *Clostridium perfringens* – газовая гангрена.
9. *Clostridium histolyticum* – газовая гангрена.
10. *Clostridium septicum* – газовая гангрена.
11. *Clostridium novyi* – газовая гангрена.
12. *Salmonella typhi* – брюшной тиф.
13. *Shigella dysenteriae* – бактериальная дизентерия.
14. *Bordetella pertussis* – коклюш.
15. *Neisseria gonorrhoeae* (гонококк) – гонорея.
16. *Neisseria meningitidis* (менингококк) – менингит.
17. *Vibrio cholerae* – холера.
18. *Rickettsia prowazekii* – эпидемический сыпной тиф.
19. *Rickettsia typhi* – эндемический или крысиный сыпной тиф.
20. *Streptococcus pneumoniae* – бактериальная пневмония.
21. *Streptococcus pyogenes* – рожа, ангина, скарлатина, абсцессы при раневых инфекциях.
22. *Bacillus anthracis* – сибирская язва крупного рогатого скота, которая передается людям.
23. *Bacillus thuringiensis* – паралитическое заболевание гусениц, чешуекрылых насекомых.
24. *Borrelia recurrentis* – эпидемический возвратный тиф или возвратная лихорадка.
25. *Leptospira canicola* – инфекционная желтуха.
26. *Pseudomonas aeruginosa* – гнойные инфекции, отиты наружного уха, эндокардиты, энтериты, пневмонии, инфекции мочевыводящих путей, артриты, остеомиелиты.
27. *Pseudomonas mallei* – сап лошадей.
28. *Klebsiella pneumoniae* – пневмонии, бактериемия, инфекции



мочевыводящих путей, диареи у новорожденных.

29. *Yersinia pestis* – бубонная или легочная чума.

30. *Dermatophilus congolensis* – дерматоз у овец и лошадей.

31. *Staphylococcus aureus* – фурункулез, эндокардиты, пневмонии, артриты, остеомиелиты, пищевые токсикоинфекции.

32. *Chlamydia trachomatis* – урогенитальный хламидиоз, венерическая лимфогранулема.

34. *Legionella pneumophila* – легионеллезы ("болезнь легионеров" или тяжелая пневмония).

35. *Mycoplasma pneumoniae* – пневмонии.

### **Возбудители бактериозов у растений:**

1. *Streptomyces scabies* – парша картофеля.

2. *Erwinia carotovora* – «мягкие» или «мокрые» гнили.

3. *Erwinia amylovora* – бактериальный ожог плодовых.

4. *Erwinia stewartii* – увядание кукурузы.

5. *Xanthomonas campestris* – черная гниль крестоцветных.

6. *Agrobacterium tumefaciens* – корончатый гал.

7. *Pseudomonas syringae* – некрозы плодовых.

8. *Pseudomonas solanacearum* – кольцевая гниль картофеля.

9. *Clavibacter sepedonicum* – кольцевая гниль картофеля.

10. *Clavibacter michiganense* – бактериальный рак томатов.

## **IV. ПРОГРАММА КУРСА «МИКРОБИОЛОГИЯ» ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЭКЗАМЕНУ**

### **Введение**

Предмет и задачи микробиологии; ее место и роль в современной биологии. Значение микробиологии для народного хозяйства и здравоохранения. Промышленная микробиология и микробиологическая технология; перспективы развития этих отраслей. Научные основы микробиологической промышленности. Связь микробиологии с другими науками. Вклад микробиологии в развитие генетики, молекулярной биологии и биотехнологии.

### **Возникновение и развитие микробиологии**

Открытие микроорганизмов А. ван Левенгуком. Роль Л. Пастера и Р. Коха в формировании микробиологии как науки. Значение работ М. Бейеринка, А. Клейвера, О. Эвери, К. Мак-Леода, К. Мак-Карти,

А. Флеминга, И. И. Мечникова, Л. С. Ценковского, Н. Ф. Гамалеи, С. Н. Виноградского, В. Л. Омелянского, Д. И. Ивановского.

Основные направления развития современной микробиологии.

Развитие и основные направления микробиологических исследований в Беларуси.

### **Микроорганизмы и их классификация**

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

Характеристика основных групп бактерий. Краткая характеристика дрожжей и мицелиальных грибов. Вирусы, отличия от клеточных организмов жизни. Бактериофаги: свойства, химический состав, строение, распространение в природе. Вирулентные и умеренные бактериофаги; особенности взаимодействия с бактериальными клетками. Фаговая конверсия.

### **Структурная организация бактериальной клетки**

Морфология и размеры бактерий.

Анатомия бактериальной клетки (схематическое строение «идеализированной» бактерии). Роль различных химических соединений в формировании клеточных структур и функционировании бактерий.

Химический состав, строение и функции клеточной стенки бактерий. Различия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Бактериальные сферопласты и протопласты: методы получения, свойства, применение. *L*-формы бактерий и их характеристика.

Химический состав, организация и функции поверхностных структур бактериальной клетки (капсулы, слизистые слои, чехлы, ворсинки). Цитоплазматическая мембрана бактерий: химическая природа, строение и функции. Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану. Производные цитоплазматической мембраны и их функции.

Цитоплазма бактерий; химический состав и организация. Внутрицитоплазматические включения; их природа и значение для клетки. Органеллы цитоплазмы и их функции. Ядерный аппарат бактериальной клетки: химическая и структурная организация, функции. Репликация

ДНК у бактерий. Регуляция клеточного деления. Концепция реплика-на.

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

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

Простые и сложные методы окраски бактериальных клеток и их назначение. Техника окраски бактериальных жгутиков. Техника и механизм окраски бактерий по методу Грама. Техника и механизм окраски кислотоустойчивых бактерий. Методы выявления бактериальных эндоспор, капсул, резервных веществ, нуклеоида. Методы изучения подвижности бактерий.

### **Культивирование и рост**

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

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

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

Методы количественного учета микроорганизмов.

### **Действие физических и химических факторов**

Действие факторов физической природы на жизнедеятельность микроорганизмов. Характер и механизмы действия химических веществ на жизнедеятельность микроорганизмов. Репарация повреждений ДНК у микроорганизмов (фотореактивация, эксцизионная и рекомбинативная репарации). Молекулярные механизмы репарационных процессов. Практическое использование химических и физических фак-

торов. Методы стерилизации, используемые в микробиологической практике.

Антибиотики; их природа и механизм действия на бактериальную клетку. Использование антибиотиков в практических целях.

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

### **Метаболизм**

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

Энергетический метаболизм. Источники энергии у микроорганизмов. Хемосинтез и фотосинтез. Способы синтеза АТФ у микроорганизмов. Пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов. Энергетический выход различных путей катаболизма глюкозы. Характеристика типов энергетического метаболизма. Аэробное дыхание – один из типов энергетического метаболизма. Синтез молекул АТФ в дыхательной цепи. Анаэробное дыхание. Доноры и акцепторы электронов, используемые разными микроорганизмами при анаэробном дыхании. Нитратное дыхание. Распространение и роль денитрифицирующих бактерий в природе. Сульфатное дыхание. Биологические свойства, распространение и значение сульфатвосстанавливающих бактерий. Карбонатное дыхание. Биологические свойства, экология и роль в природе метанообразующих бактерий. Брожение. Пути сбраживания углеводов и других соединений. Спиртовое и маслянокислое брожение; химизм и практическое использование. Молочнокислое гомо- и гетероферментативное брожения. Пропионовокислое брожение; пути образования пропионовой кислоты у прокариот. Брожение смешанного типа. Бутандиоловое брожение.

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

Биосинтез аминокислот бактериями; основные предшественники и пути биосинтеза. Биосинтез углеводов, нуклеотидов, жирных кислот и

фосфолипидов. Ассимиляция углекислоты автотрофными и гетеротрофными микроорганизмами.

### **Наследственность и изменчивость**

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

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

Техника скрещивания бактерий. Принципы отбора рекомбинантов.

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

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

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

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

### **Регуляция метаболизма**

Регуляция активности ферментов у бактерий. Ретроингибирование. Регуляция синтеза ферментов у бактерий. Оперонный принцип орга-

низации бактериальных хромосом. Индуцибельные опероны и механизмы их функционирования. Катаболитная репрессия. Диауксия. Механизмы функционирования репрессибельных оперонов.

### **Взаимоотношения микроорганизмов с микро- и макроорганизмами**

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

Взаимоотношение микроорганизмов с высшими растениями и животными. Типы взаимоотношений, примеры. Нормальная микрофлора человека, её представители и значение для организма. Эпифитная и ризосферная микрофлора растений. Микроорганизмы, патогенные для высших животных и растений, и факторы их вирулентности. Бактериальные токсины, их классификация, химическая природа и свойства. Механизм токсинообразования. Действие токсинов на восприимчивый организм. Резистентность высших организмов к патогенным бактериям. Конститутивные и индуцибельные механизмы резистентности. Химическая природа и свойства антигенов. Полноценные и неполноценные антигены. Специфичность антигенов. Антигены микроорганизмов.

### **Важнейшие группы бактерий**

Принципы классификации бактерий. Характеристика отделов царства *Prokaryotae*.

Фототрофные бактерии: систематика, биологические свойства, распространение в природе и значение.

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

Миксобактерии.

Риккетсии и их особенности.

Спирохеты.

Псевдомонады; их биохимические особенности и практическое значение.

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

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

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

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

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

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

Архебактерии. Отличие архебактерий от зубактерий. Характеристика групп архебактерий.

Микоплазмы.

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

## Литература

### *Основная:*

1. *Гусев М. В., Минеева Л. А.* Микробиология. М.: Изд-во МГУ, 1992, 448 с.
2. *Шлегель Г.* Общая микробиология. М.: Мир, 1987, 567 с.

### *Дополнительная:*

3. *Брода П.* Плазмиды. М.: Мир, 1982, 220 с.
4. *Воробьёва Л. И.* Пропионовокислые бактерии. М.: Изд-во МГУ, 1995, 286 с.
5. *Готтшалк Г. А.* Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982, 310 с.
6. *Громов Б. В.* Строение бактерий. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1985, 192 с.
7. *Громов Б. В., Павленко Г. В.* Экология бактерий. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1989, 248 с.
8. *Захаров И. А.* Курс генетики микроорганизмов. Мн.: Выш. шк., 1978, 192 с.
9. *Колешко О. И., Завезенова Т. В.* Микробиология с основами вирусологии. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1999, 452 с.
10. *Кондратьева Е. Н.* Хемолитотрофы и метилотрофы. М.: Изд-во МГУ, 1983, 172 с.
11. *Кондратьева Е. Н., Максимова И. В., Самуйлов В. Д.* Фототрофные микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1989, 376 с.
12. *Ланчини Д., Паренти Ф.* Антибиотики. М.: Мир, 1985, 272 с.
13. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир, 1987. 544 с.
14. Медицинская микробиология / Гл.ред. *В. И. Покровский, О. К. Поздеев.* М.: Гэотар Медицина, 1999, 1200 с.
15. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Под ред. *Хоулта Дж.* и др. М.: Мир, 1997.
16. *Перт С.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978, 231 с.
17. *Пехов А. П.* Основы плазмидологии. М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 1996, 231 с.
18. *Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж.* Мир микробов: В 3 т. М.: Мир, 1979.



19. *Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика. М.: Мир, 1981, 646 с.
20. *Тимаков В. Д., Левашев В. С., Борисов Л. Б.* Микробиология. М.: Медицина, 1983, 512 с.
21. *Чурикова В. В., Викторов Д. П.* Основы микробиологии и вирусологии. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1989, 277 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	Оснащение микробиологической лаборатории и правила работы в ней .....	3
2.	Питательные среды .....	3
3.	Культивирование микроорганизмов.....	9
4.	Методы стерилизации.....	12
5.	Поддержание (хранение) культур микроорганизмов.....	16
6.	Микроскопические методы исследования в микробиологии .....	20
7.	Морфология бактерий, структура и химический состав бактериальной клетки .....	23
8.	Выделение чистых культур микроорганизмов ....	33
9.	Принципы видовой идентификации микроорганизмов Изучение основных физиолого-биохимических свойств бактерий .....	40
10.	Количественный учёт микроорганизмов.....	47
11.	Действие факторов внешней среды на микроорганизмы .....	55
12.	Взаимоотношения между микроорганизмами .....	62
13.	Способы генетического обмена у бактерий.....	68
14.	Контроль самостоятельной работы студентов.....	77

Учебное издание

# **МИКРОБИОЛОГИЯ**

## **Методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов**

Авторы – составители:  
**Лысак** Владимир Васильевич  
**Желдакова** Римма Анатольевна

Ответственный за выпуск В.В.Лысак

Подписано в печать . Формат 60 x 84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл.печ.л. . Уч.-изд.л. . Тираж 300 экз. Зак.

Налоговая льгота – Общегосударственный классификатор Республики Беларусь ОКРБ 007-98, Ч. 1; 22.11.20.600.

Белорусский государственный университет  
Лицензия ЛВ № 315 от 14.07.98.  
220050, Минск, пр. Ф.Скорины, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика в Республиканском унитарном предприятии «Издательский центр БГУ».  
Лицензия ЛП № 461 от 14.08.2001.  
220030, Минск ул.Красноармейская, 6.