

ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»
Институт естественных наук

Е.И. Маградзе

**Лабораторный практикум
по микробиологии**

Учебно-методическое пособие

Издательство «Удмуртский университет»

**Ижевск
2016**

УДК 579(075.8)

ББК 88.4я73-5

М 128

Рекомендовано к изданию учебно-методическим советом УдГУ

Рецензенты: профессор кафедры биологии с экологией ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», доктор биологических наук В. А. Глумова; заведующий ПЦР-лабораторией ООО «Центр новых диагностических технологий. Медицинская лаборатория» В.В. Скурыгин.

Маградзе Е.И.

М 128 Лабораторный практикум по микробиологии: учебно-методическое пособие. – Ижевск: Издательский центр «Удмуртский университет», 2016. – 136 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для работы на лабораторных занятиях по микробиологии.

В структуре каждого занятия имеются методические указания к лабораторной работе, в которых изложены теоретические основы занятия, а также контрольные вопросы для проверки теоретической подготовленности студентов к занятию.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов бакалавриата направления «Биология».

УДК 579(075.8)

ББК 88.4я73-5

© Е.И.Маградзе, 2016

© ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
----------	---

Часть 1.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ФОРМИРУЮЩИЕ БАЗОВЫЕ НАВЫКИ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Лабораторная работа 1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней. Правила работы с микроскопом. Исследование микробов в живом состоянии	6
Лабораторная работа 2. Морфология бактерий. Простое окрашивание бактерий	16
Лабораторная работа 3. Окраска бактерий по методу Грама	22
Лабораторная работа 4. Выявление запасных веществ в клетках дрожжей	25
Лабораторная работа 5. Окраска бактериальных спор	29
Лабораторная работа 6. Приготовление питательных сред. Стерилизация	32
Лабораторная работа 7. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на плотную питательную среду	47
Лабораторная работа 8. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на плотную питательную среду (продолжение). Идентификация бактерий до рода	51
Лабораторная работа 9. Молочнокислое брожение. Накопительная культура молочнокислых бактерий. Брожение, осуществляемое бифидобактериями	55
Лабораторная работа 10. Маслянокислое брожение. Накопительная культура маслянокислых бактерий	60
Лабораторная работа 11. Аммонифицирующие бактерии и уробактерии	63
Лабораторная работа 12. Исследование качества хлебопекарных дрожжей	66

Часть 2.
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ДЛЯ БОЛЬШОГО
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПРАКТИКУМА

Тема 1. Изучение влияния различных факторов на кинетику роста дрожжей <i>Saccharomyces cerevisia</i>	69
Тема 2. Влияние бактерицидных веществ на различные виды бактерий	79
Тема 3. Действие лекарственных трав на бактерии	85
Тема 4. Действие антибиотиков на бактерии	88
Тема 5. Влияние различных факторов на инактивацию антибиотиков	96
Тема 6. Изучение антагонистического влияния стрептомицетов на почвенные бактерии	98
Тема 7. Исследование микрофлоры пищевых продуктов	107
Тема 8. Действие моющих средств на микрофлору рук, поверхностей и оборудования	111
Тема 9. Действие почвенных бактерий на рост растений	118
Тема 10. Подготовка семян к выращиванию в искусственных условиях	123
Тема 11. Влияние различных концентраций нефти на антагонизм родококков и почвенных бактерий	126
Список литературы	131
Приложение 1	133
Приложение 2	134

Введение

Лабораторные занятия играют важную роль в изучении микробиологии, так как, в отличие от других объектов биологии, микроорганизмы невозможно увидеть в повседневной жизни. Именно на лабораторных занятиях студенты знакомятся с микроорганизмами и процессами, которые осуществляют бактерии. Лабораторные занятия помогают закрепить полученные теоретические знания, овладеть основными навыками микробиологических исследований.

Практикум по лабораторным занятиям не является заменой преподавателя, помогающего в освоении практического материала. Тем не менее, практикум позволяет увеличить долю самостоятельной работы студентов на лабораторных занятиях, приучает их грамотно работать с учебной литературой. Методические указания к каждой практической работе, в которых изложены теоретические основы лабораторного занятия, а также контрольные вопросы для проверки теоретической подготовленности студентов к занятию исключают возможность автоматического, неосмысленного выполнения работы.

Первая часть практикума ориентирована на формирование базовых навыков работы с микроорганизмами. Основные задачи второй части практикума – научить студентов самостоятельно работать, применять базовые знания при решении новых задач и планировать эксперимент.

Практикум по микробиологии адресован студентам второго курса, осваивающим программу бакалавриата по биологии. Данное учебно-методическое пособие сориентировано на формирование компетенции: выпускник должен обладать способностью понимать базовые представления о разнообразии биологических объектов, значение биоразнообразия для устойчивости биосферы, способностью использовать методы наблюдения, описания, идентификации, классификации, культивирования биологических объектов

Часть 1 ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ФОРМИРУЮЩИЕ БАЗОВЫЕ НАВЫКИ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Лабораторная работа 1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней. Правила работы с микроскопом. Исследование микробов в живом состоянии

Цель работы:

1. Познакомиться с особенностями работы и правилами техники безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Изучить устройство микроскопа и правила работы с ним.
3. Научиться готовить препараты "раздавленная капля" и "висячая капля".

Методические указания

1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней

В микробиологической лаборатории студенты овладевают методами микробиологических исследований, проводят научно-исследовательскую работу.

Специфика микробиологической лаборатории обусловлена особенностями культивирования и изучения микроорганизмов, так как микробиологи в большинстве случаев имеют дело с чистыми культурами, представляющими один вид бактерий. Лаборатория должна иметь средоварочное отделение для приготовления питательных сред, автоклав для их стерилизации и для уничтожения отработанных культур, который должен находиться в отдельном помещении. Столы в лаборатории должны быть снабжены колодками с необходимыми красителями, спиртовками, микроскопами с осветителями. Обязательно наличие в лаборатории термостатов для культивирования микроорганизмов: для выращивания грибов температура в термостате должна быть 20-25°C, для большинства сапрофитов – 25-30°C, для возбудителей инфекционных болезней 35-37°C, для термофилов 40-45°C. Как правило, требуется не менее двух термостатов.

Микробиологическая лаборатория должна содержаться в чистоте. В ней не должно быть посторонних предметов и биологических объектов исследований. В лаборатории нельзя находиться в верхней одежде, во избежание заражения нельзя курить и принимать пищу. Работать следует только в халатах, во время работы избегать излишнего хождения, открывания и закрывания дверей. Необходимо аккуратно работать с культурами микроорганизмов, инструменты после использования прокалывать в пламени спиртовки, все использованные материалы с микроорганизмами, микробные культуры следует обеззараживать и только после этого мыть посуду. Не следует выносить из лаборатории предметы и вносить посторонние вещи. Личные вещи держать только в отведенном для этого месте, верхней одежды в лаборатории быть не должно. Работа с чистыми культурами микроорганизмов ведется в стерильных условиях, которые обеспечивает пламя спиртовки. Поэтому на занятиях студенты должны соблюдать правила пожарной безопасности. На лабораторном столе студент должен иметь при себе только тетрадь для записей и зарисовок препарата, цветные карандаши, ручку. Во время выполнения работы необходимо помнить основные правила техники безопасности:

- не зажигать одну спиртовку от другой, а пользоваться спичками;
- не распускать волосы при работе со спиртовками;
- не соприкасаться металлическими и другими предметами с проводами и контактными частями электросети;
- не включать электроприборы в сеть без ведома преподавателя и обслуживающего персонала;
- соблюдать правила работы с химическими реактивами.

После окончания работы студент прибирает рабочее место и обязательно моет руки.

На каждом лабораторном занятии студенты выбирают дежурного, который в начале работы получает необходимые реактивы и оборудование от лаборанта, а в конце занятия проверяет рабочие места студентов и сдает реактивы и оборудование лаборанту.

2. Устройство микроскопа и правила работы с ним

Для изучения микроорганизмов, размеры которых исчисляются в микрометрах, пользуются микроскопом. Виды микроскопии разнообразны: световая, инверсионная, конфокальная лазерная сканирующая, электронная. Электронная микроскопия позволяет получать изображения объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз. Однако для повседневных нужд микробиологов в учебных, клинических или исследовательских лабораториях наиболее часто используется световая микроскопия, так как требует меньше затрат и времени на изготовление и просмотр препарата.

Световая микроскопия подразделяется на просвечивающую (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную. Наиболее часто для учебных целей используется световая просвечивающая микроскопия.

Микроскопы постоянно совершенствуются, но основные правила работы с ними остаются неизменными.

Изображение в световом микроскопе формируется вследствие избирательного поглощения объектом света разной длины волны. Это сложный оптический прибор, состоящий из двух основных частей: механической и оптической.

Механическая часть состоит из штатива, в котором различают ножку (башмак), основание, тубусодержатель и предметный столик, крепящийся к основанию штатива. Предметный столик имеет препаратоводитель, в котором с помощью зажима закрепляют предметное стекло. Препаратоводитель перемещается в горизонтальной плоскости. С использованием препаратоводителя движение микропрепарата на предметном столике происходит плавно, без рывков. Для прохождения лучей света, освещающих препарат, в центре предметного столика есть отверстие. Макро- и микровинты изменяют расстояние между объективами и предметным столиком. Макровинт требуется для грубой, а микровинт – для более точной настройки изображения.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объективов и окуляров. Осветительный аппарат находит-

ся под предметным столиком и состоит из конденсора, и подсветки. Встречаются микроскопы, которые оснащены зеркалом для настройки освещения поля зрения. Однако в современных микроскопах подсветки светодиодные и нет необходимости улавливать зеркалом свет. Достаточно просто включить кнопку и отрегулировать яркость встроенной в микроскоп подсветки. Конденсор представляет собой систему линз, собирающих параллельные лучи и концентрирующих их в плоскости препарата. Перемещение конденсора в вертикальной плоскости осуществляется с помощью винта. Регулируя высоту конденсора, можно также регулировать яркость освещения объекта: поднимать конденсор при слабой освещенности поля зрения и опускать при слишком сильной. С помощью встроенной в конденсор ирисовой диафрагмы можно регулировать ширину светового потока путем сдвигания и раздвигания металлических сегментов рычажком.

Важную часть микроскопа составляют объективы. Они выполняют основную работу: увеличивают изображение. Каждый из объективов представляет собой систему линз в металлической оправе. Собственно увеличение дает лишь передняя или фронтальная линза. Остальные линзы коррекционные. Чем больше увеличение объектива, тем более выпуклую поверхность имеет фронтальная линза, приближаясь к форме полушара. Чем больше увеличение объектива, тем ближе он находится к поверхности препарата.

Однако качество микроскопа определяется не только увеличивающей способностью. Другой важной характеристикой является разрешающая способность. Она тем лучше, чем меньше минимальное расстояние между двумя точками, при котором еще можно их различить. В свою очередь, это минимальное расстояние, или предел разрешения, рассчитывается по формуле:

$$d = \lambda / (A_{об} + A_{конд}), \quad [1]$$

где λ – длина волны используемого света, нм;

$A_{об}$ – числовая апертура объектива;

$A_{конд}$ – числовая апертура конденсора.

Числовая апертура является мерой количества света, попадающего в линзу:

$$A = n \sin \alpha, \quad [2]$$

где n – показатель преломления среды, граничащей с линзой;

α – угол между оптической осью линзы и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в линзу.

Судя по формулам [1] и [2], увеличить разрешающую способность можно двумя способами: уменьшить длину волны света, которым освещается препарат, и увеличить апертуру. Длину волны света в обычных лабораториях, как правило, не меняют, так как для большинства микробиологических лабораторий это необоснованная трата денежных средств. Но во всех лабораториях разрешение улучшают путем увеличения апертуры. Для этого достаточно увеличить коэффициент преломления n . При работе с объективами, дающими малое увеличение, обычно разрешения хватает для того, чтобы хорошо рассмотреть микроорганизмы. В этом случае между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом находится слой воздуха. Такие объективы называют сухими. Линзы таких объективов имеют большой радиус кривизны. Работая с большими увеличениями, применяют объективы, радиус кривизны фронтальной линзы которых мал (чем больше увеличение объектива, тем меньше радиус кривизны фронтальной линзы). При этом ухудшается разрешение микроскопа, которое улучшают увеличением коэффициента преломления n . Для этого объективы погружают в каплю жидкости, показатель преломления которой отличается от показателя преломления воздуха и приближается к показателю преломления предметного стекла. Тогда световые лучи при переходе из стекла в слой жидкости не преломляются и, не отражаясь, попадают в объектив. Жидкость, применяемую для увеличения разрешения, называют иммерсионной, а объективы – иммерсионными. Чаще всего для иммерсионных объективов используют кедровое масло (при увеличении объектива в 100 раз). Реже, при 40-кратном увеличении объектива, используют воду.

Биологические микроскопы имеют обычно 3-4 объектива, дающие малое, среднее и большое увеличение. Максимальное увеличение объектива у большинства современных световых микроскопов – в 100 крат.

Окуляр располагается в верхней части тубуса микроскопа и представляет собой систему двух линз. Окуляры дают дополнительное увеличение в 5, 7, 10 и 15 раз. Наиболее четкое изображение получается при сочетании сильных объективов со слабыми и средними окулярами. Общее увеличение микроскопа определяется умножением показателя увеличения объектива на показатель увеличения окуляра.

Правила микроскопирования

1. Устанавливают объектив малого увеличения, максимально приблизив его к предметному столику. Если микроскоп снабжен зеркалом, то, наблюдая в окуляр, направляют зеркало на источник освещения, выбирая такое его положение, при котором поле зрения микроскопа имеет форму равномерно и хорошо освещенного круга. Во многих современных микроскопах регулировать освещение не надо.
2. Отрегулировав освещение, на предметный столик помещают препарат, закрепляют в препаратодателе, и, медленно поднимая тубус с помощью макровинта, находят четкое изображение препарата.
3. Если объектом исследования является препарат «раздавленная капля» или «висячая капля», то объектив малого увеличения с помощью револьвера заменяют объективом среднего увеличения. Осторожно вращая микровинт, находят четкое изображение.
4. Если объектом является сухой мазок, то его рассматривают с помощью иммерсионного объектива. Для этого на мазок помещают каплю иммерсионного масла, с помощью револьвера объектив с малым увеличением заменяют иммерсионным объективом. Если с помощью объектива малого увеличения изображение было верно найдено, то иммерсионный объектив погружится в каплю масла. Изображение находят, осторожно вращая

макровинт. Для получения четкого изображения вращают легким движением микровинт. Если при движении микровинта чувствуется сопротивление, значит, ход его пройден до конца. В этом случае винт следует повернуть на полный оборот назад, снова найти микрокартину на малом увеличении с помощью макровинта и только тогда устанавливать четкость изображения на большом увеличении с помощью микровинта.

Основные правила пользования микроскопом

1. Микроскоп нужно предохранять от попадания пыли и влаги, после работы ставить в футляр или шкаф, или накрывать.
2. При работе с объективами малого и среднего увеличения тубус перемещать только макрометрическим винтом.
3. При смене объективов регулировать освещение, поднимая или опуская тубус конденсора.
4. По окончании микрокопирования объектив следует отдалить от препарата с помощью макрометрического винта, убрать препарат, протереть окуляры и объективы замшей или фланелью. Иммерсионный объектив с показателем увеличения 90 или 100 после работы с иммерсионным маслом протереть фланелевой тряпочкой, смоченной в бензине. Ни в коем случае нельзя оставлять объектив в масле: засохшее на объективе масло в дальнейшем не даст увидеть изображение, долгий контакт с маслом портит линзы.
5. Установить малый объектив.
6. При перемещении микроскоп следует обязательно придерживать снизу, чтобы не испортить макровинт.

Важно уметь не только микрокопировать, но и зарисовывать изучаемые объекты. Микробиологи, как правило, рисуют окружность, по диаметру соответствующую полю зрения препарата, и рисуют объекты, не увеличивая и не уменьшая их размеров, которые они наблюдают в микроскоп. При подписывании препарата наряду с названием обязательно следует ставить увеличение, при котором наблюдали данный объект.

3. Приготовление препаратов живых клеток

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом нужно приготовить специальные препараты. Как правило, готовят их на хорошо очищенных и обезжиренных предметных стеклах. Под микроскопом рассматривают препараты живых и убитых микроорганизмов. Отличие первых препаратов от последних состоит в том, что живые клетки можно рассматривать под микроскопом неокрашенными.

Существует два способа приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов: «раздавленная капля» и «висячая капля».

Для приготовления препарата «раздавленная капля» на предметное стекло наносят каплю жидкости (для исследования бактерий наносят водопроводную воду, для исследования мицелиальных грибов – смесь равных объемов спирта и глицерина) с помощью пипетки или микробиологической петли помещают в нее немного исследуемых микроорганизмов. Затем каплю накрывают покровным стеклом, излишек жидкости удаляют фильтровальной бумагой и микроскопируют препарат сухими объективами 8*, *40, слегка затемняя поле. Если культура выращивается на жидкой питательной среде, то на предметное стекло наносят каплю суспензии микроорганизмов без предварительного нанесения капли водопроводной воды.

При приготовлении препарата «висячая капля» используют специальные предметные стекла с лунками, края которых смазывают вазелином для герметизации и фиксирования покровного стекла на месте. Для этой цели можно не использовать вазелин, а капнуть маленькую каплю воды на край стекла. На покровное стекло наносят каплю суспензии с микроорганизмами, осторожно переворачивают и устанавливают на предметном стекле так, чтобы капля свободно помещалась в центре лунки и висела на покровном стекле. Микроскопирование проводят аналогично микроскопированию препарата «раздавленная капля».

К достоинствам препаратов живых микроорганизмов можно отнести легкость и быстроту их приготовления. К тому же, такие препараты позволяют изучать подвижность микроорганизмов, реакцию микроорганизмов на химические и физические факторы воздействия.

Недостатками вышеназванных препаратов являются: малая контрастность (при небольшом опыте работы, а также при сильном освещении сложно увидеть неокрашенные микроорганизмы) и опасность при работе с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Практическое задание

На каждом рабочем столе должны находиться: предметные и покровные стекла, микробиологические петли, микроскопы, осветители. На общем столе находятся: бюкс с настоем гороха, бюкс с огуречным рассолом, фильтровальная бумага в чашке Петри. Настой готовят за два-три дня до занятия, заливая горох водой и сбраживая при температуре 30°C.

Приготовить препарат «раздавленная капля» из настоя гороха. Для приготовления препарата каплю настоя с помощью микробиологической петли поместить на предметное стекло и покрыть сверху покровным стеклом. Препарат рассмотреть при увеличении объектива *40. Найти подвижные формы бактерий, рассмотреть морфологию клеток и их расположение в пространстве, зарисовать в рабочей тетради, записать названия основных форм бактерий, наблюдаемых в препарате.

Приготовить препарат "висячая капля" из огуречного рассола. Для приготовления препарата использовать специальные предметные стекла с углублением (лункой). Каплю необходимо поместить на покровное стекло, перевернуть и поместить в лунку предметного стекла. Для фиксации покровного стекла на его край нанести маленькую каплю воды. Рассмотреть препарат при увеличении объектива 40. Сделать рисунок в рабочей тетради. Описать преимущества препарата "висячая капля" перед препаратом «раздавленная капля».

Контрольные вопросы к занятию

1. Каковы особенности микробиологической лаборатории?
2. Перечислите основные правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории.
3. Опишите устройство светового микроскопа.
4. Для чего нужны иммерсионные объективы?
5. Как правильно микроскопировать объект?
6. Перечислите основные правила пользования микроскопом.
7. Перечислите достоинства и недостатки препаратов живых микроорганизмов.

Лабораторная работа 2. Морфология бактерий. Простое окрашивание бактерий

Цель работы:

1. Ознакомиться с морфологией бактерий.
2. Ознакомиться с основными красителями, применяющимися в микробиологической практике.
3. Научиться готовить окрашенные препараты микроорганизмов.

Методические указания

1. Основные формы бактерий

По морфологическому разнообразию прокариоты значительно уступают эукариотам. Клетки прокариот могут быть сферической, овальной формы, в виде прямых или изогнутых палочек, спиралей, ветвящихся и неветвящихся нитей или пластинок.

Шаровидные, или кокковидные формы (кокки (греч. *coccus* – зерно, ягода)), по расположению в пространстве разделяют на:

- микрококки – одиночно расположенные клетки;
- диплококки (греч. *diplos* – двойной) – кокки, расположенные парно;
- тетракокки (греч. *tetra* – четыре) – кокки, соединенные по четыре;
- стрептококки (греч. *streptos* – витой, плетеный) – кокки, соединенные в виде цепочки;
- сарцины (лат. *sarcina* - тук) – кокки, расположенные в виде пакетов, которые образуются в результате деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях;
- Стафилококки (греч. *staphyle* – виноградная гроздь) – располагаются беспорядочно, скопления кокков напоминают гроздь винограда.

Палочковидные бактерии делят на неспорообразующие (бактерии (греч. *bacteria* - палочка)) и спорообразующие (бациллы (лат. *bacillus* - палочка) и клостридии (др. греч *closter* - веретено)). По расположению клеток их делят на:

- Бактерии (бациллы) – одиночно расположенные палочки;
- диплобактерии (диплобациллы) – соединенные попарно палочки
- стрептобактерии (стрептобациллы) – палочки, расположенные в виде цепочки.

Извитые бактерии подразделяют на:

- вибрионы, имеющие форму запятой;
- спириллы, имеющие до 4 завитков;
- спирохеты, имеющие более 4 мелких завитков.

На рисунке 1 приведены основные формы бактерий, которые наиболее часто встречаются в культурах микроорганизмов.

2. Характеристика красителей, применяющихся в микробиологии

Анилиновые красители, наиболее часто используемые для окраски клеток, в зависимости от окрашивающих ионов делят на кислые и основные. Кислые красители окрашивают цитоплазматические включения клеток, когда как основные красители интенсивно связываются с ДНК и РНК. Так как концентрация нуклеиновых кислот в цитоплазме прокариот высока, то в микробиологической практике предпочтение отдается основным красителям. Для простого окрашивания клеток чаще всего используются фуксин (малиново-красный цвет), метиленовый синий, генциановый фиолетовый, сафранин (красного цвета), судан (от желтого до красного цвета). Для растворения красителей в большинстве случаев используется этанол, некоторые красители требуют добавления других органических жидкостей. Например, фуксин и генциановый фиолетовый лучше растворяются в смеси этанола с фенолом. Концентрированные растворы редко используются в микробиологической практике. Чаще их разводят водой в определенных соотношениях.

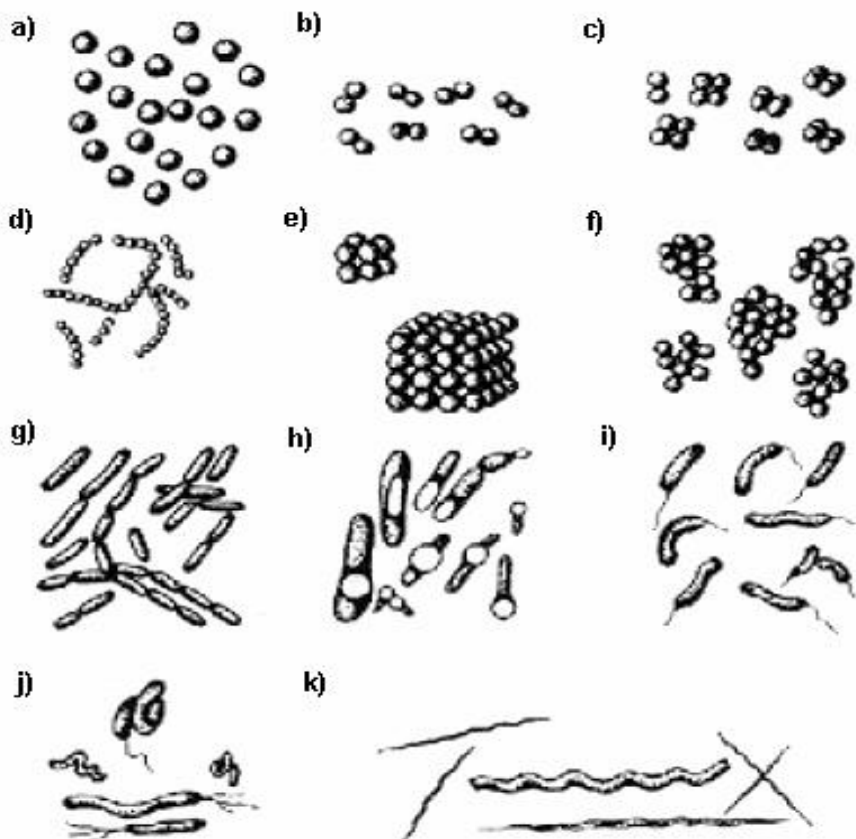


Рисунок 1. Основные формы бактерий.

Условные обозначения: а) монококки (*Monococcus*), б) диплококки (*Diplococcus*), в) тетракокки (*Tetracoccus*), д) стрептококки (*Streptococcus*), е) сарцины (*Sarcina*), ф) стафилококки (*Staphylococcus*), г) бактерии, диплобактерии, стрептобактерии (*Bacterium*, *Diplobacterium*, *Streptobacterium*), h) бациллы (*Bacillus*), и) вибрионы (*Vibrio*), j) спириллы (*Spirillum*), k) спирохеты (*Spirochetæ*).

В зависимости от степени разведения красителя окрашивание клеток варьирует от 1 до 5 минут. Самым мощным красителем, используемым в повседневной практике, является фуксин. Он

окрашивает большинство бактерий в течение нескольких секунд, и часто дает чрезмерную окраску. Однако если клетки кислотоустойчивы, то они плохо окрашиваются фуксином.

Практическое задание

На каждом рабочем столе должны находиться: предметные и покровные стекла, микробиологические петли, микроскопы, осветители, колодка с красителями, микробиологические мостики для окрашивания препаратов, спиртовки для работы в стерильных условиях, спички. На общем столе находятся: пробирки с чистыми культурами микроорганизмов, емкости с дезинфицирующим раствором для использованных предметных стекол.

Приготовление препарата включает следующие этапы:

1. **Приготовление мазка.** На обезжиренное предметное стекло помещают небольшую каплю водопроводной воды. Микробиологическую петлю тщательно прокаливают в пламени спиртовки. Из пробирки с чистой культурой в приготовленную каплю микробиологической петлей стерильно, работая над пламенем спиртовки, переносят небольшое количество материала и размазывают по стеклу. Мазок высушивают на воздухе.

Высушивание над пламенем горелки может изменить морфологию объектов исследования. В хорошем мазке количество воды должно быть таким, чтобы капля не успела высохнуть до внесения в нее материала, однако при размазывании по стеклу она должна быстро высохнуть. Мазок должен быть равномерным и тонким.

2. **Фиксация мазка.** Предметное стекло с высохшим мазком 3-4- раза проводят через пламя горелки. Цель фиксации: убить бактерии и прикрепить мазок к стеклу.

Убитые клетки более восприимчивы к окраске, чем живые, и, следовательно, лучше видны в микроскоп. Клетки убивают также для того, чтобы обезопасить работу с ними. Прикрепленные к поверхности бактерии не смываются вместе с красителем во время промывания водой.

3. **Окраска мазка.** После фиксации на мазок наносят краситель таким образом, чтобы вся поверхность мазка была окрашена. Во время окрашивания мазка при необходимости можно добавить дополнительную порцию красителя. Время выдержки 1-3 минуты. Студентам на выбор предоставляются фуксин, метиленовый синий, генциановый фиолетовый.

Количество красителя должно быть достаточным, чтобы за время окраски мазок не высыхал, иначе при микроскопии такого препарата в поле зрения видны капли сухого красителя, окрашенное стекло. Иногда для получения более чистых препаратов краситель наносят на фильтровальную бумагу, помещенную на мазок.

4. **Промывание мазка.** По окончании окраски препарат промывают водой. Промывание можно проводить струей воды до тех пор, пока вода не перестанет окрашиваться. Затем препарат высушивают фильтровальной бумагой.

Если необходим подсчет микроорганизмов в мазке, то препарат осторожно помещают в несколько стаканов с водой во избежание смыва верхнего слоя клеток с поверхности мазка. В этом случае мазок высушивают на воздухе.

5. **Микроскопия препарата.** На готовый мазок помещают каплю +иммерсионного масла и просматривают с объективом х90. Препарат должен быть полностью высушенным, так как иммерсионное масло образует эмульсию с остатками влаги на стекле, что значительно ухудшает качество просматривания препарата.

Если препарат правильно приготовлен, окрашен и промыт, то в поле зрения нет окрашенного фона, окрашены только клетки. Клетки зарисовывают, препарат убирают, помещают в посуду с дезинфицирующим раствором. Прибирают рабочее место и сдают дежурному.

Контрольные вопросы к занятию

1. Как различают кокковидные бактерии по расположению в пространстве?
2. Как различают палочковидные бактерии по расположению в пространстве
3. Как различают извитые бактерии?
4. Назовите основные отличия препарата фиксированных окрашенных клеток от препарата «раздавленная капля».
5. Почему для окрашивания микроорганизмов используют основные красители?
6. Назовите этапы приготовления препарата окрашенных микроорганизмов.

Лабораторная работа 3. Окраска бактерий по методу Грама

Цель работы:

1. Ознакомиться с принципом окраски по методу Грама
2. Научиться окрашивать бактерии по методу Грама.

Методические указания

В 1884 году датский ученый Христиан Грам предложил способ окраски, позволяющий разделить бактерии на две группы. В одну группу входили бактерии, цитоплазма которых после окраски комплексом генцианового фиолетового с йодом не обесцвечивалась этанолом, в другую группу входили бактерии, у которых этанол обесцвечивал окрашенную цитоплазму. В дальнейшем по имени ученого бактерии стали называть, соответственно, грамположительными и грамотрицательными.

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком. У грамположительных бактерий клеточная стенка удерживает краситель при обработке этанолом благодаря значительной толщине муреина, основного компонента клеточной стенки (до 40 слоев). У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тонкая. 1-2 слоя муреина, входящие в ее состав, не могут удержать краситель внутри клетки после обработки этанолом. Бактерии легко обесцвечиваются. Для того, чтобы увидеть грамотрицательные бактерии в микроскоп, их дополнительно окрашивают фуксином или сафранином. В результате грамотрицательные бактерии приобретают красную окраску и их легко отличить от грамположительных прокариот, окрашенных в синий цвет.

Так как многие виды бактерий грамовариабельны в зависимости от возраста, то обычно по Граму окрашивают молодые, чаще всего суточные, культуры. Именно такие клетки имеются в виду, когда в различных определителях описывают способность тех или иных видов бактерий окрашиваться по Граму.

Практическое задание

На каждом рабочем столе должны находиться: предметные стекла, микробиологические петли, микроскопы с осветителями,

колодка с раствором Люголя, фуксином, 96%-ным этанолом, чашка Петри с кусочками фильтровальной бумаги, пропитанной генциановым фиолетовым, микробиологические мостики для окрашивания препаратов, спиртовки для работы в стерильных условиях, спички. На общем столе находятся: пробирки с чистыми культурами микроорганизмов, фильтровальная бумага для высушивания готовых препаратов, ёмкости с дезинфицирующим раствором для использованных предметных стекол.

Перед работой каждый студент получает по две пробирки с чистыми культурами грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Приготовление препарата включает следующие этапы:

1. **Приготовление мазка.** В каплю воды, нанесенную на обезжиренное предметное стекло, помещают две культуры, соблюдая стерильные условия. Чтобы не нарушить стерильность чистых культур, микробиологическую петлю перед отбором каждой культуры и после использования прокалывают в пламени горелки. Мазок размазывают по стеклу только после внесения в каплю двух исследуемых культур. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки.
2. **Окраска мазка.** Окраска по Грамму является сложной, так как в процессе работы используется несколько красителей. Здесь очень важна очередность окрашивания:
 - На фиксированный мазок наносят генциановый фиолетовый краситель. Время окраски 2 минуты.
 - По истечении времени окрашивания краситель сливают. Не промывая препарата, на него наносят раствор Люголя. Время обработки Раствором Люголя 1-2 минуты. При этом мазок чернеет.
 - Раствор Люголя сливают. Препарат обесцвечивают этанолом в течение 30 секунд.
 - Препарат быстро промывают водой и окрашивают фуксином 1-2 минуты.
 - Фуксин сливают, препарат промывают, высушивают и микроскопируют с масляной иммерсией.

Если мазок правильно окрашен, то в поле зрения микроскопа грамположительные клетки выглядят сине-фиолетовыми, грамотрицательные – розово-красные. Бактерии зарисовывают, записывают названия грамположительных и грамотрицательных бактерий, препарат убирают, помещают в посуду с дезинфицирующим раствором. Рабочее место прибирают и сдают дежурному.

Обесцвечивание этанолом – самая ответственная стадия окраски по Граму. Отсчет времени следует начинать после нанесения первой же капли этилового спирта, после 30 секунд сразу промывать водой. Пренебрежение этими условиями отразится на качестве препарата. Если препарат выдержать в этаноле дольше требуемого времени, то могут обесцветиться не только грамотрицательные, но и грамположительные клетки. При выдержке в этаноле меньше 30 секунд, этого времени может не хватить для обесцвечивания грамотрицательных клеток.

Контрольные вопросы к занятию

1. Перечислите по порядку основные этапы окраски мазка по Граму.
2. Для чего необходима стадия обработки препарата этиловым спиртом?
3. Для чего необходимо на последнем этапе окрашивать препарат фуксином?
4. Почему для окраски по Граму берут суточные бактериальные культуры?

Лабораторная работа 4. Выявление запасных веществ в клетках дрожжей

Цель работы:

1. Закрепить знания о роли запасных веществ в бактериальной клетке.
2. Выявить гранулы гликогена в клетках дрожжей.
3. Выявить липидные гранулы в клетках дрожжей.
4. Выявить полифосфатные гранулы в клетках дрожжей.

Методические указания

Большинство микроорганизмов могут синтезировать запасные вещества. Это полимерные молекулы, нерастворимые в цитоплазме, и поэтому они не вовлекаются в клеточный метаболизм. Запасные вещества синтезируются, если в питательной среде не хватает некоторых элементов, необходимых для роста бактерий (источники азота или фосфора), либо присутствуют ингибиторы роста.

Бактерии не имеют возможности размножаться, однако поглощают питательные вещества из окружающей среды. Часть этих веществ полимеризуется в клетке, превращаясь в запасные вещества. Когда в окружающей среде появляются недостающие элементы для роста или из нее удаляется ингибитор роста бактерий, в клетке активируются гидролитические ферменты, расщепляющие запасные полимеры до мономеров. Мономеры растворяются в цитоплазме и активно включаются в метаболизм.

Синтез запасных веществ имеет экологический смысл. В природе отдельные виды бактерий не существуют обособленно от других. Бывает, что нехватка некоторых элементов тормозит размножение одних видов, но не влияет на размножение других видов бактерий. Когда в окружающей среде появляются необходимые компоненты, может оказаться, что активно размножающиеся бактерии практически полностью использовали основной субстрат. В таких случаях запасные вещества, гидролизуясь в клетке, становятся источником энергии и углерода. Некоторые запасные вещества становятся источником фосфора.

Основными запасными веществами микроорганизмов являются:

1. Полимеры глюкозы. Наиболее часто встречаются гликоген и крахмал. Мономер глюкоза, образующаяся при расщеплении этих запасных веществ, является источником энергии и углерода в клетке.
2. Полиоксикислоты. Мономерами являются оксикислоты – источник энергии и углерода. Оксикислоты, образующиеся при расщеплении полиоксикислот, являются строительным материалом при биосинтезе клеточных мембран.
3. Полифосфаты. Мономер – фосфат. Фосфаты необходимы клетке для синтеза ряда важных молекул.

Практическое задание

На каждом рабочем столе должны находиться: предметные стекла, микробиологические петли, микроскопы, осветители, колodka с раствором Люголя, сафранином, суданом III, метиленовым синим по Лёффлеру, 1%-ным раствором серной кислоты, микробиологические мостики для окрашивания препаратов, спиртовки для работы в стерильных условиях, спички. На общем столе находятся: лабораторные стаканы с суспензией дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в которую добавлены небольшое количество сахарозы и 1-2 капли 1%-ной серной кислоты, фильтровальная бумага для высушивания готовых препаратов, ёмкости с дезинфицирующим раствором для использованных предметных стекол. В вытяжном шкафу находится ксилол.

1. Выявление гранул гликогена. Так как гликоген является веществом углеводной природы, его выявляют обработкой клеток раствором Люголя. Для этого на предметное стекло помещают небольшую каплю суспензии дрожжей, добавляют в нее каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом *40. Во избежание попадания влаги на объектив, избыток жидкости, выступающей за края покровного стекла необходимо удалить кусочками фильтровальной бумаги. В поле зрения видны клетки дрожжей, окра-

шенные в желтый цвет. Гранулы гликогена внутри дрожжей окрашены в коричневый цвет.

2. Выявление липидных гранул. Готовят тонкий мазок клеток, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки. Для окрашивания гранул используют липофильный краситель Судан III. Красителем заливают мазок на 12 минут, затем сливают. Для обесцвечивания цитоплазмы препарат, не промывая, несколько раз погружают в ксилол. После этого клетки в течение 10 секунд дополнительно окрашивают сафранином, так как без окраски цитоплазмы дрожжи не будет видно в микроскоп. На последней стадии приготовления препарата краситель тщательно смывают водой, препарат просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Используемый объектив – *90. В поле зрения на розовом фоне цитоплазмы дрожжей видны липидные гранулы темно-красного цвета.

Окраска сафранином более 10 секунд нежелательна, так как цитоплазма в этом случае окрашивается в более темный цвет. В этом случае окраска фона будет сливаться с окраской гранул.

3. Выявление гранул полифосфатов. Готовят тонкий мазок клеток, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки. На мазок наносят метиленовый синий по Лёффлеру и окрашивают в течение 3 минут. Краситель сливают, препарат промывают водой, не высушивают (!). На мазок наносят каплю 1%-ного раствора серной кислоты, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом *40. Для предохранения объектива от повреждений избыток жидкости, выступающей за края покровного стекла, необходимо удалить кусочками фильтровальной бумаги. Гранулы полифосфата имеют свойство изменять цвет некоторых красителей, в том числе метиленового синего. Поэтому в поле зрения на слабоголубом фоне цитоплазмы видны гранулы, окрашенные в сине-фиолетовый цвет.

При оформлении протокола исследования, помимо основных записей, для каждого препарата необходимо самостоятельно

написать структурные формулы веществ, из которых состоят гранулы.

В конце работы препараты помещают в посуду с дезинфицирующим раствором, прибирают рабочее место и сдают дежурному.

Контрольные вопросы к занятию

1. Почему запасные вещества так называют?
2. Почему запасные вещества являются полимерами?
3. В каких условиях клетки синтезируют запасные вещества?
4. Какова роль гликогена в бактериальной клетке? Напишите структурную формулу полимера.
5. Какова роль полимеров оксокислот в бактериальной клетке? Напишите структурную формулу полимера поли- β -гидроксимасляной кислоты.
6. Какова роль полифосфатов в бактериальной клетке? Напишите структурную формулу полимера.

Лабораторная работа 5. Окраска бактериальных спор

Цель работы:

1. Закрепить знания о стадиях образования эндоспор и их роли в жизни бактерий.
2. Научиться окрашивать эндоспоры бактерий.

Методические указания

Некоторые роды грамположительных бактерий, такие как *Bacillus*, *Clostridium*, способны в неблагоприятных условиях образовывать эндоспоры. Для выявления эндоспор используют старые культуры. Различают три типа спорообразования: бациллярное, клостридиальное и плектридиальное. Если при образовании споры в центре клетки форма ее не меняется, то такой тип спорообразования называется бациллярным. Если клетка в середине утолщается и приобретает вид веретена, то такой тип спорообразования называется клостридиальным. Иногда спора образуется ближе к концу клетки и тогда клетка приобретает вид теннисной ракетки. Такой тип спорообразования называется плектридиальным. Расположение споры в клетке может быть центральным, терминальным и латеральным. Свободные споры могут иметь круглую, овальную или продолговатую форму. Каждый отдельный вид спорообразующих бактерий образует только один тип споры, имеющей только одно определенное расположение. Иными словами, спорообразование, тип споры и ее расположение являются таксономическими признаками бактерий, по которым можно определить их вид.

Практическое задание

На каждом рабочем столе должны находиться: предметные стекла, микробиологические петли, микроскопы, осветители, спиртовки, спички, держатели для предметных стекол, колодка с фуксином по Цию, метиленовым синим, 0,5%-ным раствором соляной кислоты, 1%-ным раствором серной кислоты, микробиологические мостики для окрашивания препаратов. На общем столе находятся: пробирки с чистыми культурами бактерий рода *Bacillus*, фильтровальная бумага для высушивания готовых препаратов, ём-

кости с дезинфицирующим раствором для использованных предметных стекол.

Окраска спор производится по методу Ожешки.

1. Приготовление и фиксация мазка. На предметное стекло помещают каплю водопроводной воды, в которую, соблюдая стерильность, переносят материал из пробирки с чистой культурой. Готовя тонкий мазок, высушивают на воздухе. Для фиксации мазка на стекло наносят 0,5%-й раствор соляной кислоты, закрепляют стекло в держателе и нагревают над пламени горелки 2 минуты.

На данной стадии важно, чтобы в течение времени фиксации мазок не оставался сухим, при этом не рекомендуется доливать кислоту в процессе испарения. После фиксации препарат охлаждают на воздухе и промывают водой.

2. Окрашивание препарата. Мазок закрепляют в держателе, накрывают фильтровальной бумагой, на которую наливают первую порцию фуксина по Цилю. Препарат в течение 5 минут выдерживают над пламенем горелки, подливая краситель по мере высыхания.

Особенность данной стадии: не допускать полного высыхания красителя: прилипшая к предметному стеклу краска не позволит рассмотреть препарат под микроскопом.

3. После кипячения с фуксином предметное стекло охлаждают на воздухе и промывают до тех пор, пока вода не станет прозрачной. Затем, для обесцвечивания вегетативных клеток препарат на 1,5-2 минуты заливают 1%-м раствором серной кислоты.
4. Препарат снова промывают и в течение 10-12 минут окрашивают метиленовым синим. По окончании времени окраски мазок промывают под струей воды, высушивают и просматривают с иммерсионной системой. В поле зрения видны синие вегетативные клетки и ярко-красные споры.

Студенты зарисовывают клетки в тетрадь, записывают тип спорообразования, расположения спор в клетке, а также форму

свободных спор. По окончании практической работы студенты прибирают рабочее место и сдают его дежурному.

Контрольные вопросы к занятию

1. Назовите условия, при которых бактерии образуют споры.
2. Нарисуйте схему спорообразования. Какие стадии образования спор являются обратимыми?
3. Назовите оболочки споры.
4. Почему споры нельзя окрасить методом простой окраски?
5. Для чего споры кипятят в фуксине?
6. Для чего бактериальный препарат, содержащий споры, после кипячения в фуксине обрабатывают серной кислотой?
7. Для чего необходима стадия дополнительной окраски препарата метиленовым синим?

Лабораторная работа 6. Приготовление питательных сред. Стерилизация

Цель работы:

1. Ознакомиться с принципами составления питательных сред.
2. Ознакомиться с основными методами стерилизации.
3. Подготовить питательные среды и необходимые материалы для культивирования микроорганизмов.

Методические указания

1. Принципы составления питательных сред

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируют на питательных средах. Метаболические реакции прокариот, а, следовательно, и потребности в питательных веществах, чрезвычайно разнообразны. Поэтому не существует универсальной питательной среды, на которой могли бы расти все культивируемые бактерии.

При составлении питательных сред для различных бактерий необходимо учитывать несколько основных факторов: наличие в питательной среде необходимого количества воды, доступного для бактерий источника энергии и химических элементов, необходимых для конструктивного метаболизма прокариот; а также состав, физическое состояние и назначение питательной среды.

Вода является обязательным компонентом питательных сред, так как бактерии потребляют питательные вещества в растворенном виде. Кроме того, основные биологические процессы протекают в водной среде. Вода должна находиться в жидкой фазе, в доступной для клеток форме. Доступность воды в субстрате выражают величиной активности воды a_w , которая равна соотношению P/P_0 , где P – давление пара над раствором, P_0 – давление пара над чистой водой при данной температуре. Чем больше в воде растворенных веществ, тем меньше ее доступность, тем меньше активность воды. Большинство бактерий растут на питательных средах с активностью a_w , равной 0,99-0,95. Как правило, в питательных средах для многих видов бактерий общая концентрация питательных веществ не превышает 3%. Для сравнения, дрожжи и мицелиаль-

ные грибы могут расти на питательных средах с активностью воды до 0,63.

Питательная среда должна содержать источники энергии доступные для прокариот. Для хемоорганотрофов в питательную среду добавляют органические вещества, хемолитотрофам источником энергии служит неорганический субстрат. В питательную среду для фототрофов источник энергии не добавляют, так как им является свет.

Для осуществления жизненных циклов, для построения клеточных структур микроорганизмы нуждаются в таких химических элементах, как углерод, водород, кислород, азот, сера, фосфор и так называемые микроэлементы калий, натрий, кальций, магний, марганец, медь, железо и т.д. Кислород и водород содержатся практически в каждом органическом субстрате, поэтому источники этих элементов рассматриваться не будут.

По способности использовать те или иные источники углерода микроорганизмы делят на автотрофы и гетеротрофы. Автотрофы используют углерод только в виде углекислого газа. В питательные среды для гетеротрофов добавляют органические соединения. В большинстве случаев источники углерода для гетеротрофов являются и источниками энергии. В природе практически нет органических соединений, которые не используются микроорганизмами. В лабораторных условиях основными источниками углерода являются углеводы, реже спирты и кислоты, еще реже нефтепродукты.

Из углеводов наиболее часто добавляемый в питательную среду источник углерода – глюкоза или фруктоза. Эти сахара практически сразу включаются в энергетический метаболизм клеток. Ди- и полисахариды медленнее вовлекаются в клеточный метаболизм, так как предварительно должны гидролизиться до моносахаров, иначе не смогут пройти через цитоплазматическую мембрану внутрь клетки. Если глюкоза и фруктоза являются доступным субстратом для многих гетеротрофов, то ди- и полисахариды доступны только для тех бактерий, которые имеют соответствующие гидролитические ферменты. Приведем несколько примеров. Саха-

роза состоит из фруктозы и глюкозы. Этот дисахарид расщепляется с помощью инвертазы. В лабораторных условиях на сахарозе культивируют многие виды гетеротрофов, однако их количество меньше, чем видов, растущих на глюкозе. Лактоза еще менее распространенный источник углерода. Для ее расщепления до глюкозы и галактозы требуется фермент β -галактозидаза. Однако очень немногие культивируемые микроорганизмы имеют этот фермент. Полисахарид крахмал расщепляется до глюкозы амилазами, ферментами, которые вырабатывают немногие виды гетеротрофов. Небольшое количество видов культивируемых микроорганизмов могут вырабатывать целлюлазы для расщепления целлюлозы.

Азот входит в состав таких веществ клетки как белки и нуклеиновые кислоты. Эти химические компоненты составляют до 80% сухого вещества клетки. Поэтому азот, по потребности в нем бактерий, стоит на втором месте. Как правило, в питательные среды добавляют азот в 6 раз меньше по массе, чем углерод. Клетка содержит приблизительно в три раза меньше азота, чем углерода, однако большее соотношение N:C в питательных средах объясняется тем, что источник углерода используется не только в биосинтетических целях, но и для получения энергии. Разнообразие источников азота велико. Небольшое количество видов микроорганизмов способно потреблять атмосферный азот. Некоторые виды хорошо растут на неорганических азотсодержащих соединениях: нитратах, нитритах, гидроксиламине. Многие культивируемые в лаборатории микроорганизмы хорошо растут на ионах аммония. Аминокислоты (от одной до нескольких) также являются одним из самых распространенных источников азота в питательных средах. Гораздо реже используются белки, так как для их расщепления и включения в метаболизм бактерии должны иметь протеазы.

Сера входит в состав белков, однако нужна клеткам в значительно меньшем количестве, чем азот и углерод. Потребность в сере многие бактерии удовлетворяют за счет сульфатов. Реже встречаются бактерии, которые требуют наличия в среде восстановленной серы. В таких случаях вносят сульфиды.

Фосфор является важным компонентом клеток. В виде фосфатов он входит в состав таких жизненно важных молекул как нуклеиновые кислоты, АТФ, фосфолипиды цитоплазматической мембраны. Для удовлетворения микроорганизмов в фосфоре в питательные среды вносят соли фосфорной кислоты.

Такие металлы как калий, натрий, кальций нужны клетке в качестве регуляторов осмотического давления, клеточного цикла. Они требуются микроорганизмам в количестве большем, чем микроэлементы (магний, железо, марганец, кобальт, медь). Микроэлементы, за исключением железа, нужны как кофакторы, их добавляют в микроколичествах. Все металлы добавляют в среду в виде катионов или анионов органических солей.

Помимо источников тех или иных химических элементов в питательные среды добавляют факторы роста: пурины, пиримидины, витамины, аминокислоты. Пурины, пиримидины нужны для синтеза нуклеиновых кислот, аминокислоты – для синтеза белков, витамины используются клеткой как коферменты. Эти вещества необходимы тем микроорганизмам, которые не способны их синтезировать. Такие микроорганизмы называются ауксотрофами. В отличие от них прототрофы не нуждаются в добавке в питательную среду факторов роста.

По составу питательные среды делят на природные (натуральные), синтетические и полусинтетические. Натуральные среды состоят из продуктов животного или растительного происхождения. Чаще всего, это отвары или экстракты из природных субстратов: мяса, рыбы, овощей, фруктов. Состав таких питательных сред точно не определен и незначительно варьирует от партии к партии. Положительным моментом в использовании таких сред является то, что они имеют сложный состав и, как правило, не требуют дополнительных добавок микроэлементов, факторов роста и т.д. Недостатком таких сред является то, что из-за сложности состава их нельзя использовать для исследования биохимических свойств микроорганизмов.

К натуральным также относят среды, приготовленные на основе отходов некоторых производств. Достоинством таких сред

является низкая стоимость, что позволяет использовать их в микробиологическом производстве, где потребность в больших объемах субстратов должна сочетаться с требованием к невысокой стоимости конечного продукта. Приведем примеры таких сред.

Меласса – отход производства сахара из сахарной свеклы. Содержит в себе сахарозу, инвертные сахара, азотистые вещества, аминокислоты, минеральные соли.

Гидрол и зеленая патока – отход производства глюкозы из крахмала. Содержат редуцирующие сахара, из которых 80% составляет глюкоза. Помимо сахаров эти среды содержат органические кислоты и минеральные элементы.

Картофельный крахмал применяют в микробиологическом производстве в тех случаях, когда продуценты имеют амилазы. Помимо крахмала в этой среде содержатся белки, жиры, зольные элементы.

Гидролизаты полисахаридов – это растительные отходы. Среди них можно назвать гидролизаты древесины, торфа. Такие питательные среды содержат гексозы, пентозы, органические кислоты.

Молочная сыворотка, отход производства кисломолочных продуктов, содержит лактозу, белок казеин, небольшое количество органических кислот, витаминов и т.д. На сыворотке могут расти только микроорганизмы, продуцирующие ферменты, расщепляющие молочный сахар.

Среди источников азота наиболее распространены кукурузный экстракт и гидролизаты дрожжей. Кукурузный экстракт получают при производстве крахмала из зерен кукурузы. В зависимости от сорта кукурузы в этом источнике азота содержится от 15 до 18 аминокислот. В небольшом количестве кукурузный экстракт содержит углеводы, молочную кислоту, витамины, микроэлементы.

Гидролизат дрожжей, отход производства пекарских дрожжей, содержит большое количество белка и аминокислот, витамины группы В, микроэлементы. Гидролизат может быть получен путем кислотного либо ферментативного гидролиза или экстракцией дрожжевой биомассы.

Синтетические питательные среды отличаются от натуральных постоянным составом. Они имеют точные прописи состава, для их приготовления используют химически чистые вещества. Синтетические питательные среды незаменимы в исследовательских работах при изучении физиологии и биохимии микроорганизмов. Разнообразие их велико. Рецепты основных синтетических сред для тех или иных групп микроорганизмов можно найти во многих микробиологических практикумах.

Полусинтетические среды состоят из натуральной основы с добавлением строгого количества химических веществ. В ряде случаев они восполняют недостатки непостоянного состава натуральных сред.

По физическому состоянию питательные среды делят на жидкие, полужидкие (вязкие), твердые и сыпучие. Жидкие питательные среды используют для накопления биомассы бактерий или продуктов метаболизма, для исследования кинетических параметров роста микроорганизмов, для роста и хранения бактерий, плохо развивающихся на плотных средах.

Плотные питательные среды отличаются от жидких наличием в питательной среде уплотнителя, который представляет собой вещество, связывающее жидкость. Таким образом, в плотных питательных средах сохраняется такая же активность воды, что и в жидких питательных средах. Для уплотнения в микробиологической практике используют желатин, агар, кремнекислый гель.

Желатин – белок, получаемый из костей, хрящей и кожи животных. Желатин имеет ряд существенных недостатков: температура застывания 6-10°C, температура плавления 30-32°C. Неудобство состоит в том, что для застывания питательные среды необходимо помещать в холодильник; невысокая температура плавления не позволяет культивировать на среде с желатином бактерии, оптимум роста которых выше 28°C. Еще одним минусом в использовании желатина является его доступность в качестве субстрата для бактерий, обладающих протеазной активностью. Поэтому чаще всего желатин используют для определения способности бактерий расщеплять белки: если микроорганизмы разжижают

питательную среду, то они имеют протеазы. Не менее существенным недостатком этого уплотнителя является высокая концентрация желатина в плотной питательной среде: 15-20%.

Самым популярным у микробиологов уплотнителем питательной среды является агар. Это полисахарид, получаемый из водорослей, недоступный в качестве питательного вещества для большинства культивируемых микроорганизмов. Агар – это поистине подарок природы для микробиологов. Температура плавления среды, содержащей агар, 100°C, температура застывания – 45°C. Высокая температура плавления позволяет культивировать на такой плотной питательной среде даже некоторые виды экстремально термофильных микроорганизмов. Не очень высокая температура застывания позволяет заливать суспензию, содержащую микроорганизмы, расплавленной питательной средой с температурой не более 50°C. При таком температурном воздействии микроорганизмы не гибнут. Не дожидаясь застывания агара, питательную среду смешивают с суспензией микроорганизмов и оставляют застывать.

При культивировании на данной питательной среде растут не только аэробы, но и факультативные и строгие анаэробы. Концентрация агара в плотной питательной среде составляет 1,5-2%. Единственным недостатком этого уплотнителя является выделение конденсационной воды при использовании питательной среды. Однако серьезных неудобств он не вызывает. Чашки Петри при культивировании помещают крышкой вниз, и конденсационная влага накапливается на крышках, не размывая колонии. Конденсационная вода при культивировании микробов в пробирках зачастую не приносит неудобств.

Гораздо реже, чем агар и желатин, для культивирования бактерий используют силикагель. К его достоинствам можно отнести то, что он является веществом неорганической природы, поэтому его используют для уплотнения синтетических сред. Огромным недостатком является необходимость проведения большой предварительной работы и неопределенность концентрации силикагеля в питательной среде.

Полужидкие, или вязкие, среды получают, добавляя к жидким питательным средам агар в концентрации 0,5-0,75%.. Такие среды используют для культивирования анаэробов, так как чем больше вязкость питательной среды, тем меньше растворимость в ней кислорода.

Сыпучие среды представляют собой разваренное зерно, отруби, которые имеют в себе достаточно воды для жизнедеятельности бактерий или мицелиальных грибов. Их относят к средам неопределенного состава, включающим в себя углеводы, микроэлементы, азотистые вещества, органические кислоты. Их удобно использовать в некоторых микробиологических производствах.

По назначению питательные среды делят на селективные и дифференциально-диагностические. Селективные среды предназначены для развития микроорганизмов преимущественно одного вида или близкородственных видов, при этом другие виды микроорганизмов на них расти не способны. Такие питательные среды предназначены для первичного выделения нужного вида микроорганизмов из природных субстратов. Примером может служить картофельная среда для картофельной палочки или молоко для молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды нужны для идентификации микроорганизмов. Чаще всего они применяются в медицинской и санитарной микробиологии. Это могут быть как отдельные среды, так и специальный ряд. В качестве примера отдельных сред может служить среда Эндо для идентификации бактерий группы кишечной палочки, которые дают на ней колонии малинового цвета с металлическим блеском.

Примером ряда индикаторных сред служит пестрый ряд Гисса. Эти питательные среды различаются по источнику углерода. Каждая питательная среда содержит рН-индикатор и специальный поплавок. Как правило, для определения видовой принадлежности микроорганизма его высевают на несколько различных питательных сред Гисса. После определенного времени культивирования проверяют наличие роста бактерий в пробирках и делают заключение о способности микроорганизмов потреблять тот или иной ис-

точник углерода. О выделении в среду в качестве метаболита кислоты или щелочи судят по изменению цвета рН-индикатора среды. Если в процессе культивирования бактерий поплавок в питательной среде заполняется пузырьками газа, то это говорит о способности данного вида к газообразованию. По совокупности всех признаков по специальным таблицам определяют вид бактерий.

В последние десятилетия в микробиологической практике большую роль стали играть готовые питательные среды промышленного производства. Основные достоинства: среды представляют собой сухие порошки, поэтому имеют длительный срок хранения при условии соблюдения простых правил; просты в приготовлении (взвешивается необходимое количество порошка и разводится определенным объемом воды). В ряде случаев раствор нужно только довести до кипения, а затем проавтоклавировать. Однако в микробиологической лаборатории еще часто бывают случаи, когда для культивирования того или иного вида микроорганизма не существует производственных сред, поэтому они готовятся самими исследователями.

2. Методы стерилизации

Стерилизация (лат. – «обеспложивание») – полное уничтожение микроорганизмов в объекте теми или иными методами. Это необходимо в микробиологической практике, в медицине, в пищевой промышленности. Микробиологи часто имеют дело с чистыми культурами микроорганизмов, для работы с которыми требуется предварительная стерилизация питательных сред и других материалов. В медицинской практике стерильность важна при проведении хирургических операций, различных медицинских процедур. В пищевой промышленности особо важную роль стерильность играет при производстве консервов.

Методы стерилизации сложны и разнообразны. Объясняется это разнообразием свойств объектов стерилизации и тем, что споры микроорганизмов хорошо переносят неблагоприятные для вегетативных клеток условия. Способы стерилизации делят на термические и холодные.

К термическим методам относят автоклавирование, стерилизацию в сухожаровом шкафу, тиндализацию, стерилизацию в пламени горелки.

Автоклавирование проводят в специальных сосудах под давлением – автоклавах. Стерилизующий агент – насыщенный пар под давлением. Избыточное давление применяют для того, чтобы повысить температуру кипения воды, а, следовательно, и парообразования. Наиболее часто используемые режимы автоклавирования – 0,5 и 1,1 ати (*атмосфер избыточных*, то есть, положительной разности между абсолютным и атмосферным давлением), что соответствует температурам парообразования 111°C и 121°C. Время выдержки стерилизуемого материала в автоклаве при указанных режимах зависит от стерилизуемых объектов. Чем больше объем или площадь поверхности объекта – тем дольше время стерилизации. Имеются субстраты, в которых могут быть споры, отличающиеся особой термостабильностью. Такие объекты стерилизуют в течение 1-2 часов. Среднее время выдержки при 111°C 30 минут, при 121°C – 22 минуты. Использование насыщенного пара является не менее важным условием автоклавирования, чем температура парообразования. Так как вода и пар проводят тепло намного лучше, чем воздух, то присутствие в стерилизующей камере даже 1% воздуха снижает теплопередачу на 60%. Поэтому перед стерилизацией проводят продувку паром, выгоняя воздух из стерилизационной камеры. К тому же, во влажной среде быстрее, чем в горячем воздухе, протекают процессы денатурации белков у бактерий. Поэтому в автоклаве стерилизуемые агенты размещают так, чтобы доступ пара к ним был свободным. Объекты, которые подвергаются стерилизации в автоклаве: питательные среды, выдерживающие температуру нагрева выше 100°C, стеклянная посуда, резиновые предметы, хирургический инструмент.

В отличие от автоклава, в сухожаровом шкафу стерилизующим агентом является воздух. Из-за плохой проводимости тепла воздухом температура стерилизации в сухожаровом шкафу выше и время стерилизации дольше, чем в автоклаве. Тем не менее, сухожаровой шкаф используется не менее часто, чем автоклав. В нем

стерилизуют хирургические инструменты, стеклянную посуду, порошки и вязкие жидкости. Стеклянная посуда и хирургические инструменты в сухожаровом шкафу не подвергаются воздействию влаги. Поэтому хирургические инструменты меньше подвергаются коррозии, а стеклянную посуду после стерилизации в сухожаровом шкафу не нужно сушить перед употреблением. Сушка посуды после автоклава обязательна, потому что бумага, в которую завертывают посуду, намокает, и на ней могут прорасти споры мицелиальных грибов, осевшие на бумагу из воздуха.

Порошки и вязкие жидкости можно стерилизовать только в сухожаровом шкафу, так как они плохо передают тепло, а, следовательно, медленно прогреваются. Времени стерилизации в автоклаве обычно недостаточно для их прогрева. Режим стерилизации в сухожаровом шкафу: 160°C – 2 часа, 180°C – 1 час.

Одним из современных способов сухожаровой стерилизации является гласперленовая. Заполненное кварцевыми шариками пространство стерилизатора нагревают до 250-330°C, инструменты помещаются между шариками, время стерилизации от 20 секунд до 3 минут. Шарики, в отличие от воздуха, хорошо проводят тепло к поверхности металлических инструментов, поэтому стерилизация проходит быстро, поверхность инструментов меньше повреждается, чем при более традиционных методах стерилизации. Этот метод пригоден для стерилизации хирургических, стоматологических, маникюрных инструментов.

Тиндализация, или дробная стерилизация, предназначена для питательных сред, не выдерживающих воздействие температур выше 100°C. Среды стерилизуют в кипятильнике Коха. Среды несколько раз выдерживают при 100°C 10-20 минут. После каждого прогрева среды ставят в термостат при температуре 30°C на сутки для прорастания жизнеспособных спор, так как такое нагревание обеспечивает лишь гибель вегетативных клеток. Обычно двух нагревов хватает, для того, чтобы простерилизовать среды. Третий прогрев контрольный. Питательные среды, не выдерживающие нагрев выше 80°C, тиндализуют пять раз при температуре

70°C. Время выдержки 20-25 минут. Между нагревами питательные среды помещают в термостат на 24 часа при температуре 30°C.

Стерилизация в пламени горелки является самой быстрой из всех термических методов. Температура пламени в самой горячей части свыше 1000°C. Время стерилизации занимает несколько десятков секунд. Таким методом стерилизуют предметы, которые сразу же должны использоваться, так как за пределами пламени, они очень быстро контаминируются микроорганизмами. Это предметы из металла и стекла: предметные и покровные стекла, микробиологические петли и иглы, пробкорезы, шпатели, пинцеты, скальпели.

Подготовка питательных сред и инструментов к термической стерилизации.

Питательные среды, воду наливают в пробирки, колбы, бутылки. Емкости заполняют жидкостью наполовину, чтобы предотвратить смачивание пробок во время стерилизации. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, которые хорошо пропускают пар, а после стерилизации пропускают воздух, но не пропускают микроорганизмы из воздуха. Посуду, инструменты, изделия из резины заворачивают в бумагу, каждый предмет в отдельности. Стерилизовать без бумаги нельзя, так как объекты после стерилизации сразу подвергаются контаминации из внешней среды.

К методам холодной стерилизации относят фильтрацию, ультрафиолетовое и рентгеновское облучение, лучи радиоактивных элементов, газовую стерилизацию и стерилизацию химическими веществами.

Фильтрация применяется для стерилизации питательных сред, не выдерживающих нагревания либо растворов, содержащих аминокислоты, витамины, белки. Например, таким образом стерилизуют лекарственные средства, содержащие белок, которые предназначены для внутривенного введения. Фильтрацией также стерилизуют большие объемы воздуха, необходимого для поддержания стерильности в стерильном помещении, где постоянно действует принудительная вентиляция. В очень больших объемах стериль-

ный воздух требуется также в микробиологическом производстве на стадии биосинтеза, если выращивается аэробная чистая культура. В таких случаях к воздуху предъявляются жесткие требования по чистоте: 99,9999% или 99,99999%. Данные цифры означают, что в первом случае есть вероятность, что в 10^6 м^3 воздуха останется одна бактерия, во втором случае эта вероятность рассчитана на 10^7 м^3 воздуха.

Ультрафиолетовые лучи действуют в основном на нуклеиновые кислоты. Наиболее эффективны лучи ближней ультрафиолетовой области с длиной волны около 260 нм. При воздействии ультрафиолетовых лучей ковалентно связываются два соседних тиминовых основания в ДНК. Недостатком применения ультрафиолетового облучения является длительность воздействия. Время стерилизации зависит от мощности ламп и от площади стерилизуемого объекта. При недостаточном времени выдерживания стерилизуемого объекта можно получить мутантные формы микроорганизмов. Другим важным недостатком ультрафиолетовых лучей является их неспособность проникать сквозь поверхности. Поэтому использование УФ-лучей в качестве стерилизующего агента ограничено. Таким способом стерилизуют поверхности и воздух в помещениях.

Ионизирующее излучение применяют для стерилизации пищевых продуктов, а также одноразовых инструментов на стадии их изготовления.

Для стерилизации оборудования, содержащего оптические, зеркальные, радиоэлектронные части, изделий из термолабильной пластмассы используют газы. Газовая стерилизация является одним из дорогих методов обеспложивания. Для этого метода используют газы со спороцидными свойствами: окись этилена, метилбромид, окись пропилена, формальдегид и др. Наиболее эффективна смесь окиси этилена и метилбромида. Стерилизацию проводят в специальных герметичных ёмкостях, после стерилизации газ в ёмкостях заменяют на биологически инертный газ, например, азот. Объекты выдерживают в азоте 24 часа для освобождения от остатков стерилизующего газа после стерилизации.

Стерилизация химическими веществами используется при обработке поверхностей, мебели. Так как обработанные поверхности в скором времени контаминируются микрофлорой из окружающего пространства, то целесообразней назвать этот процесс дезинфекцией.

Практическое задание

Работу проводят два студента.

Для культивирования микроорганизмов необходимо приготовить и подготовить к стерилизации питательный агар. Студенты готовят 150 мл питательной среды: взвешивают питательный агар согласно инструкции к питательной среде, помещают в колбу, заливают 150 мл водопроводной воды и перемешивают так, чтобы комочки среды не прилипали к стенкам и дну колбы. Питательную среду доводят до кипения, следя за тем, чтобы агар полностью растворился, а также, чтобы вспенившаяся среда не «сбежала» на плитку. Слегка остудив, питательную среду разливают в пробирки, заполняя их примерно на 2/3 объема. Пробирки плотно закрывают ватно-марлевой пробкой, так как неплотно держащиеся пробки могут вылететь при автоклавировании.

Студенты подготавливают к стерилизации воду для разведения исходного материала перед высевом микроорганизмов на питательную среду. Для этого по 9 мл водопроводной воды наливают в 8 пробирок и подбирают к ним ватно-марлевые пробки таким образом, чтобы они плотно закрывали пробирки.

Студенты подготавливают к стерилизации посуду: 6 чашек Петри заворачивают в бумагу, складывая ее конвертом; каждую из 9 пипеток заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см, предварительно вставив в широкий конец ватный фитиль.

Питательную среду и воду студенты отдают лаборанту для автоклавирования, посуда сдается для стерилизации в сухожаровом шкафу.

Контрольные вопросы к занятию

1. Как классифицируют питательные среды по составу?

2. Как классифицируют питательные среды по физическому состоянию?
3. Как классифицируют питательные среды по назначению?
4. Назовите источники углерода, используемые для культивирования микроорганизмов.
5. Назовите источники азота, которые используют для приготовления питательных сред.
6. Назовите источники серы, фосфора, микроэлементов, которые используют при приготовлении питательных сред.
7. Что такое факторы роста?
8. Назовите основные методы термической стерилизации. Какие объекты стерилизуют этими методами?
9. Назовите основные методы холодной стерилизации и объекты, которые стерилизуют этими методами.

Лабораторная работа 7. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на плотную питательную среду

Цель работы:

1. Ознакомиться с принципами выделения микроорганизмов из сред обитания по методу Коха.
2. Научиться высевать бактерии на плотную питательную среду из различных природных субстратов.

Методические указания

Метод высева микроорганизмов на плотные питательные среды из различных природных субстратов

Данный метод используют для определения числа жизнеспособных микроорганизмов в естественных субстратах. В его основе лежит принцип Р. Коха, согласно которому колония является потомством одной клетки.

Одним из недостатков этого метода является то, что с помощью него можно определить только минимальное число микроорганизмов, находящихся в данном субстрате. Это объясняется тем, что не существует универсальных питательных сред, учитывающих питательные потребности всех микроорганизмов, поэтому вырастают только те бактерии, которые способны расти на питательной среде данного состава. Важной причиной того, что микробиологи не могут определить полное число жизнеспособных особей в том или ином субстрате, является и то, что в природе много нерастущих или очень медленно растущих видов микроорганизмов, которые невозможно культивировать в лабораторных условиях. Кроме того, принцип «бактерии одной колонии являются потомством одной клетки» является допущением. На питательную среду могут осесть, например, несколько сцепленных между собой клеток.

Высев клеток из твердых или жидких природных субстратов осуществляется методом Р. Коха, который включает в себя три этапа: приготовление разведений, посев на плотную питательную среду в чашки Петри и подсчет колоний. Высев бактерий из возду-

ха происходит путем оседания микроорганизмов на плотную питательную среду в течение определенного промежутка времени.

Численность микроорганизмов в природных субстратах обычно очень велика, поэтому, чтобы бактерии росли на питательной среде не сплошным газоном, а единичными колониями, необходимо разведение суспензии, содержащей исходный материал. В микробиологической практике используют ряд последовательных разведений. Наиболее часто применяют коэффициент разведения, равный 10.

Практическое задание

В работе студенты используют стерильные питательные среды, воду и посуду, приготовленные на предыдущем занятии.

1). Определение числа жизнеспособных бактерий в 1 г. почвы методом Коха.

Всю работу необходимо выполнять быстро, но без суетливости и спешки.

А) Взвесить 1 г почвы, стерильно поместить в пробирку с 9 мл стерильной воды, закрыть ватно-марлевой пробкой и встряхивать в течение 5 минут для ускорения перехода микроорганизмов из твердой фазы в водную. Затем пробирку на 5 минут поставить в штатив для того, чтобы осадить почвенные частицы.

Б) Приготовить суспензию с разведением 10^5 или 10^6 . Так как в первой пробирке (см. пункт А) разведение равно 10, то для дальнейших разведений потребуется 4 или 5 пробирок с 9 мл стерильной воды. Желательно пробирки пронумеровать. Для каждого разведения нужно брать стерильную пипетку.

Непосредственно перед приготовлением разведения из первой пробирки необходимо взять стерильную пипетку, надорвать бумагу посередине и освободить верхнюю часть пипетки, снабженную ватой. Затем освободить от бумаги нижний кончик пипетки и, не касаясь её руками, ничего не задевая, ввести пипетку в первую пробирку, открытую в стерильных условиях (над пламенем горелки). Быстро несколько раз втянуть и выдуть из пипетки суспензию. После перемешивания набрать миллилитр суспензии в пи-

петку и стерильно перенести во вторую пробирку, не касаясь пипеткой воды. Для приготовления разведения из второй пробирки, необходимо взять стерильную пипетку и провести те же манипуляции.

Каждая стерильная пипетка используется однократно только для перемешивания суспензии в пробирке и переноса из нее отобранного объема. Нельзя одной и той же пипеткой перемешивать суспензию в двух пробирках, так как это приводит к искажению результатов: на наружной стороне пипетки при переносе микроорганизмов всегда остается какое-то их количество, которое нежелательно заносить в другую пробирку.

В) Из последнего разведения стерильной пипеткой, предварительно перемешав суспензию втягиванием и выдуванием, отобрать 1 мл и поместить в стерильную чашку Петри. Чтобы не нарушить стерильность в чашке Петри, крышку чашки приоткрывать только в момент внесения суспензии. Причем, приоткрывать крышку следует так, чтобы в образовавшуюся щель могла пройти только пипетка в наклонном положении.

Г) Суспензию в чашке Петри залить питательным агаром. Для этого расплавленный агар остудить до 50°C (температура, когда держать пробирку в ладони некомфортно, но терпимо). Остуженную питательную среду вылить в чашку Петри, соблюдая стерильность. Для этого нужно быстро вытащить пробку из пробирки, приоткрыть чашку Петри так, чтобы в образовавшуюся щель проходило горлышко пробирки, и быстро вылить всю питательную среду. Чашку закрыть, перемешать содержимое, аккуратно вращая на столе, и оставить застывать.

Д) После застывания агара чашку Петри перевернуть, подписать и поставить в термостат. Чашка обязательно должна стоять крышкой вниз, так как конденсат, который выделяется при застывании агара, может размыть колонии растущих бактерий, если будет скапливаться на питательной среде.

2). Определение числа жизнеспособных бактерий в 1мл воды методом Коха.

А) Из стакана с водой, взятой из аквариума, водопроводного крана и т.д., стерильной пипеткой отобрать 1 мл, стерильно поместить в пробирку с 9 мл стерильной водой.

Б) Приготовить суспензию с разведением 10^2 или 10^3 . Так как в первой пробирке (см. пункт А) разведение равно 10, то для дальнейших разведений потребуется 1 или 2 пробирки с 9 мл стерильной воды. Желательно пробирки пронумеровать. Для каждого разведения нужно брать стерильную пипетку.

Далее разведение и посев проводить аналогично эксперименту с почвенными микроорганизмами.

3) Определение числа жизнеспособных бактерий в воздухе.

А) В стерильную чашку Петри залить 15-17 мл расплавленного агара, и, не открывая крышки, оставить до застывания питательной среды.

Б) Когда питательная среда застынет, подойти с закрытой чашкой Петри к месту отбора пробы и на 5 минут полностью открыть чашку. При этом необходимо соблюдать правила: чашку Петри держать от себя не ближе, чем длина вытянутой руки, крышку держать не очень близко от чашки, не переворачивая, время экспозиции выдерживать точно. По окончании времени экспозиции чашку закрыть, подписать. В термостат чашки Петри ставят крышкой вниз для того, чтобы конденсат не накапливался на питательной среде. Иначе конденсат может размыть колонии, что затруднит их подсчет.

Контрольные вопросы к занятию

1. Почему из природных сред мы не можем выделить все микроорганизмы?
2. Какие этапы включает в себя выделение микроорганизмов по методу Коха?

Лабораторная работа 8. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на плотную питательную среду (продолжение). Идентификация бактерий до рода

Цель работы:

1. Научиться рассчитывать количество микроорганизмов в исходном образце;
2. Сделать выводы о наличии микроорганизмов в исходном образце
3. Определить преобладающие формы бактерий в природном образце.

Методические указания

Почва и вода содержат большое число бактерий.

Почва является гетерогенной средой, в которой протекает множество процессов с участием микроорганизмов. Минимальное число жизнеспособных бактерий в почве, как правило, не менее 10^6 . Считается, что чем более окультурена почва, тем больше в ней содержится микроорганизмов. Почва представляет собой наиболее важное местообитание прокариот в отношении поддержания роста растений, питания человека и химической стабильности атмосферы.

Количество бактерий в толще воды зависит от условий среды: температура, pH, освещенность, наличие питательных веществ, аэрация, состав биоты водоема и т.д. Помимо природных условий на численность бактерий в воде влияют антропогенные загрязнения. Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего числа микроорганизмов в 1 мл воды и выявлению патогенной микрофлоры.

Критерии годности питьевой воды:

- пригодна для питья – в 1мл обнаружено не более 100 бактерий;
- сомнительного качества – 100-500 клеток в 1 мл воды;
- непригодна для питья – свыше 500 бактерий в 1 мл воды.

Вода непригодна для питья, если в ней обнаружены бактерии группы кишечной палочки, что говорит о фекальном загрязне-

нии. Кишечные палочки являются санитарно-показательными микроорганизмами воды.

Воздух не является средой обитания микроорганизмов. Бактерии попадают в воздух из верхних слоев сред обитания и могут переноситься воздушными токами. Воздух закрытых помещений содержит микроорганизмы с кожных и шерстяных покровов, из носоглотки, с белья и одежды, из пыли, из грязи, занесенной с улицы и т.д. Бактериальная обсемененность воздуха в жилых помещениях больше, чем в атмосферном воздухе. Для снижения численности бактерий в воздухе помещений, среди которых могут быть и патогенные виды, попадающие в воздух от больных людей и животных, необходимо помещения проветривать.

В атмосферный воздух бактерии попадают в основном, из почвы. Количество бактерий в атмосферном воздухе зависит от времени года, от высоты над землей, от влажности воздуха и т.д. Зимой бактерий в воздухе содержится меньше, чем летом. Чем выше над землей, тем чище воздух.

Критерии чистоты воздуха в помещениях:

- чистый воздух – до 2000 клеток в 1м^3 ,
- умеренно чистый воздух – от 2000 до 4000 бактерий в 1м^3 ,
- слабозагрязненный воздух – от 4000 до 7000 бактерий в 1м^3 ,
- загрязненный воздух – свыше 7000 бактерий в 1м^3 .

Санитарно-показательными микроорганизмами в воздухе являются стафилококки, гемолитические стрептококки, которые являются показателями контаминации воздуха микрофлорой носоглотки человека.

Практическое задание

В начале работы студенты получают чашки Петри с выросшими микроорганизмами, которые были посеяны на предыдущем занятии. При определении числа микроорганизмов чашки Петри открывать не рекомендуется.

1) Определение числа жизнеспособных клеток в 1 грамме почвы.

Посчитать количество колоний, выросших на чашке Петри с бактериями, посеянными из почвы. Зная кратность разведения сус-

пензии, и допустив, что из одной бактерии вырастает одна колония, самостоятельно рассчитать минимальное количество жизнеспособных бактерий в 1 грамме почвы. Сделать выводы по микробному обсеменению почвы.

2) Определение числа жизнеспособных клеток в 1 миллилитре воды.

Посчитать количество колоний, выросших на чашке Петри с бактериями, посеянными из воды. Зная кратность разведения суспензии, и допустив, что одна бактерия дает потомство в виде одной колонии, самостоятельно рассчитать минимальное количество жизнеспособных бактерий в 1 миллилитре воды. Сделать выводы о пригодности воды в качестве источника питья.

3) Определение числа жизнеспособных бактерий в 1 м³ воздуха.

Расчет минимального количества жизнеспособных микроорганизмов в воздухе провести по методу Омелянского: за 5 минут на 100 м² питательной среды оседает столько бактерий, сколько их содержится в 10 литрах воздуха. Для этого необходимо рассчитать площадь поверхности питательной среды в чашке Петри, посчитать количество выросших колоний и рассчитать количество бактерий в 1 м³ воздуха, сделав необходимые перерасчеты. Сделать выводы о чистоте воздуха в помещении, где был проведен отбор пробы.

4) Выбрать чашки Петри с микроорганизмами, посеянными из почвы, воды или воздуха, выбрать колонии, преобладающие по численности на питательной среде. Приготовить мазки, окрасить простой окраской и определить морфологию бактерий. По полученным данным сделать выводы о формах бактерий, преобладающих в данном природном субстрате.

Контрольные вопросы к занятию

1. Как определить минимальное число бактерий, содержащихся в 1 г. почвы и 1 мл воды?
2. Почему невозможно выделить из почвы все виды почвенных микроорганизмов?

3. Какие микроорганизмы являются санитарно-показательными при определении качества воды и почему?
4. Как определить минимальное число бактерий, содержащихся в воздухе?
5. Какие микроорганизмы являются санитарно-показательными при определении микробного загрязнения воздуха и почему?

Лабораторная работа 9. Молочнокислое брожение. Накопительная культура молочнокислых бактерий. Брожение, осуществляемое бифидобактериями

Цель работы:

1. Научиться определять наличие молочной кислоты в среде качественными методами
2. Научиться рассчитывать количество кислоты, накапливаемой в среде в ходе брожения
3. Рассмотреть в микроскоп молочнокислые бактерии и бифидобактерии

Методические указания

Молочнокислое брожение является одним из самых примитивных способов получения энергии живыми существами на Земле. Продуктом брожения является молочная кислота, понижающая рН окружающей среды до 4-5. Благодаря кислым условиям, которые создают вокруг себя молочнокислые бактерии, они не имеют конкурентов за субстрат, и поэтому выживают в природе, несмотря на свой примитивный метаболизм. Молочнокислые бактерии – прихотливые микроорганизмы, растущие на богатых средах, содержащих, помимо источника углерода, аминокислоты, витамины, микроэлементы. Одна из самых предпочтительных природных сред для молочнокислых бактерий – молоко. В процессе роста на молоке эти микроорганизмы снижают рН среды и способствуют свертыванию молочного белка казеина.

Кислотность сброженного молока определяют титрованием 0,1н. раствором NaOH и выражают в градусах Тернера.

Градус Тернера – это объем 0,1н. раствора щелочи в миллилитрах, который израсходован на титрование 100 мл жидкости (например, молока).

Зная объемы титруемой жидкости и щелочи, нейтрализующей эту жидкость, можно легко сделать перерасчет на градусы Тернера.

Градусы Тернера позволяют судить о накоплении молочной кислоты в молоке, так как щелочь практически полностью нейтра-

лизует кислоту, каким бы слабым электролитом та не была. В отличие от градусов Тернера, рН показывает только концентрацию протонов в среде, судить по этому показателю о накоплении кислоты невозможно. Молочная кислота является слабой кислотой, а молоко является хорошим буфером. Когда рН среды достигает значения 4-4.5, то в дальнейшем оно не изменяется и не зависит от количества молочной кислоты, продолжающей выделяться из клеток, так как эта кислота плохо диссоциирует, и концентрация протонов в этой среде уже не изменяется.

Массу образующейся молочной кислоты можно посчитать, зная соотношения количества вещества кислоты и нейтрализующей её щелочи, а также исходя из разности кислотностей ферментированного и неферментированного молока. Наличие в среде молочной кислоты можно определить по качественным реакциям.

Молочнокислые бактерии являются грамположительными. Палочковидные бактерии не образуют спор, несмотря на историческое название *Lactobacillus*. Бактерии рода *Streptococcus* располагаются небольшими цепочками, *Leuconostoc* и *Pediococcus* представляют собой диплококки.

Бифидобактерии также выделяют молочную кислоту, но в ходе другого брожения – фосфокетолазного, при котором 2 моль глюкозы окисляются до 3 моль уксусной и 2 моль молочной кислоты. Массу кислот можно посчитать способом, аналогичным расчету массы молочной кислоты, выделяемой молочнокислыми бактериями.

Бифидобактерии – грамположительные палочки неправильной формы. Свое название эти микроорганизмы получили за V или Y-образную форму, так как в переводе с латинского *bifidus* значит «раздвоенный». Растут на сложных питательных средах, таких как тиогликолевая, бифидум-среда. Наряду с лактобактериями бифидобактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника. Кислоты, продуцируемые этими микроорганизмами, снижают рН в окружающей среде и тем самым подавляют развитие условно-патогенных и патогенных бактерий. Бифидобактерии продуцируют также белково-полисахаридный комплекс, который поз-

воляет им образовывать микроколонии, что повышает устойчивость этих микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды. Белково-полисахаридный комплекс обладает также бактерицидным действием в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

Практическое задание

А) Определение количества молочной кислоты по разности кислотностей сброженного и несброженного молока.

Работу проводят два студента. На каждом столе имеются бюретки объемом 25 мл, стаканы объемом 100-150 мл, мерные цилиндры объемом 25 мл, конические колбы вместимостью 50 мл, на общем столе стоят колбы с молочной сывороткой, полученной сбраживанием свежего молока, и свежим молоком, раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор натриевой щелочи.

Бюретки заполняют раствором щелочи так, чтобы носик бюретки был полностью заполнен раствором, а нижний мениск щелочи находился на нулевой отметке. Так как кислотность молока ниже, чем кислотность молочной сыворотки, то целесообразно первым титровать молоко. Для этого в коническую колбу наливают 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1-2 капли фенолфталеина и титруют до появления слабо-розовой окраски. Затем измеряют объем щелочи, израсходованной на титрование и самостоятельно пересчитывают в градусы Тёрнера.

Аналогично проводят титрование молочной сыворотки. По разнице в градусах Тернера между сывороткой и молоком, определяют количество молочной кислоты, накопленной в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

Б) Качественное определение молочной кислоты. Реакция Уффельмана.

Определение основано на способности молочной кислоты обесцвечивать раствор, полученный при сливании хлорного железа (III) с фенолом (образуется комплексный фенолят). На часовое стекло наносят каплю хлорного железа и несколько капель фенола, отмечают цвет полученного раствора, затем добавляют каплю мо-

лочной сыворотки и отмечают изменение цвета раствора (образуется лактат железа)

В) Изучение морфологии бактерий, вызывающих молочно-кислое брожение.

Для определения морфологии молочнокислых бактерий делают мазок из капли молочной сыворотки или из творожного сгустка, который образуется при сбраживании молока. Мазок высушивают, а затем фиксируют смесью Никифорова (этанол: диэтиловый эфир = 1:1) в течение одной минуты, опуская стекло несколько раз в стаканчик со смесью. При этом происходит не только гибель клеток и прилипание бактерий к предметному стеклу, но и извлечение жиров из мазка, которые значительно усложняют микроскопирование. После фиксации мазок окрашивают раствором метиленового синего в течение 1-2 минут, препарат промывают водой, высушивают и рассматривают под микроскопом с объективом *90. Если мазок приготовлен правильно, то на голубом фоне слабо окрашенного белка молока (казеина) четко видны темно-синие бактерии. Палочки принадлежат к роду *Lactobacillus*, их размеры колеблются от 0,7 до 8 мкм. Морфология молочнокислых палочек отличается большим разнообразием – от коротких коккообразных до нитевидных палочек, расположенных единично, или собранных в цепочки. Бактерии рода *Streptococcus* образуют цепочки. Диплококки, состоящие из вытянутых, бобовидных кокков – *Leuconostoc*.

Г) Определение количества молочной и уксусной кислот, выделяемых бифидобактериями.

Работу проводят два студента. Для титрования пользуются оборудованием, описанным в пункте 1. Объектом исследования служит пробирка с бифидобактериями, выращенными на бифидум-среде. В качестве контроля используется стерильная бифидум-среда. Студенты определяют рН стерильной и сброженной бифидум-среды по методике, описанной в пункте А.

По разнице в градусах Тернера между стерильной и сброженной бифидум-средой определяют количество молочной и ук-

сусной кислот, накопленных в результате жизнедеятельности бифидобактерий.

Д) Изучение морфологии бифидобактерий.

Студенты готовят мазок из капли, которую отбирают пипеткой из пробирки со сброженной бифидум-средой. Каплю равномерно распределяют по стеклу, дают ей высохнуть, фиксируют мазок над пламенем горелки и окрашивают рабочим раствором фуксина в течение 1 минуты. После окраски препарат промывают, сушат фильтровальной бумагой. Микроскопируя препарат, необходимо увидеть особенности морфологии бифидобактерий, а также характерные скопления клеток, объединенные белково-полисахаридным комплексом.

В рабочих тетрадах должны быть представлены: расчет количества молочной кислоты (г/л), образуемой молочнокислыми бактериями в результате брожения; расчет количества молочной и уксусной кислот (г/л), образуемых бифидобактериями; описание качественной реакции на молочную кислоту и выводы; рисунки просмотренных микроорганизмов.

Контрольные вопросы к занятию

1. Перечислите бактерии, осуществляющие молочнокислое брожение. Почему молочнокислые бактерии являются прихотливыми микроорганизмами?
2. Являются ли бифидобактерии молочнокислыми бактериями? Обоснуйте свой ответ.
3. Как пересчитать количество градусов Тернера в концентрацию (г/л) молочной кислоты в сыворотке?

Лабораторная работа 10. Маслянокислое брожение. Накопительная культура маслянокислых бактерий

Цель работы:

1. Знать основные этапы приготовления накопительной культуры маслянокислых бактерий *Clostridium*
2. Научиться определять наличие масляной кислоты в среде, содержащей клостридии
3. Научиться выявлять клостридии в препарате.

Методические указания

Маслянокислое брожение осуществляют бактерии рода *Clostridium*, грамположительные палочки. Это почвенные анаэробные бактерии, оптимальная температура роста которых 28-30°C. Эти микроорганизмы не так прихотливы, как молочнокислые бактерии: они подвижны, имеют ферменты для расщепления крахмала, способны превращать молекулярный азот в органические азотсодержащие соединения, способны образовывать в неблагоприятных условиях споры.

Маслянокислое брожение является более передовым по сравнению с молочнокислым. На 1 моль глюкозы клостридии получают примерно в два раза больше энергии, чем молочнокислые бактерии. Некоторые промежуточные метаболиты энергетического метаболизма являются исходными веществами в анаболизме. Тем не менее, не следует забывать, что брожение является одним из самых примитивных способов получения энергии живыми существами. Конечными продуктами маслянокислого брожения являются масляная кислота, уксусная кислота, углекислый газ и водород.

Практическое задание

Материал для исследования – элективная культура маслянокислых бактерий. Для получения культуры высокую пробирку объемом 30 мл наполняют на $\frac{1}{4}$ объема разрезанным на мелкие кубики картофелем. Картофель должен быть немывтым и очищенным. Затем пробирку на $\frac{3}{4}$ объема заполняют водой, добавляют соды на

кончике ножа для нейтрализации клеточных кислот картофеля. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, прогревают на кипящей водяной бане 10 минут и выдерживают в термостате при 28-30°C 2-3 суток.

Студенты проводят на занятии несколько опытов.

А) Качественное определение масляной кислоты.

Для определения масляной кислоты отбирают 1 мл сброженной жидкости, переносят в пробирку, добавляют несколько капель 96%-ного этилового спирта и одну каплю концентрированной серной кислоты. Пробирку равномерно нагревают, держа над пламенем горелки с помощью держателя, до появления запаха ананаса.

Масляную кислоту определяют еще одним способом. К 1 мл сброженной жидкости, находящейся в пробирке, добавляют несколько капель хлорида железа (III) и нагревают над пламенем горелки до изменения окраски. Образуется маслянокислое железо коричневого цвета.

Б) Изучение морфологии и подвижности *Clostridium sp.*

Готовят препарат «раздавленная капля», отбирая пробу со дна пробирки, содержащей накопительную культуру. Для этого пипетку вводят в пробирку до самого дна, предварительно зажав ее широкий конец пальцем. У самого дна палец убирают с пипетки, дают жидкости немного всосаться в пипетку, затем ее широкий конец снова зажимают и пипетку выводят из пробирки. Такой способ отбора пробы позволяет избежать всасывания жидкости с поверхности или из средних слоев пробирки. Каплю жидкости наносят на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают при увеличении *40. Клостридии выглядят в поле зрения как подвижные крупные палочки. Многие имеют на конце спору. К препарату добавляют раствор Люголя и снова рассматривают с помощью микроскопа. Так как клостридии содержат крахмалоподобное вещество гранулёзу, то они окрашиваются йодом в темно-синий цвет. Подвижность маслянокислых бактерий при этом утрачивается.

В лабораторной тетради студенты должны записать формулу эфира, запах которого напоминает ананас, формулу масляно-кислого железа, зарисовать клостридии.

Контрольные вопросы к занятию

1. Объясните каждый из этапов приготовления накопительной культуры *Clostridium*.
2. Напишите уравнение реакции получения эфира из масляной кислоты и этилового спирта.
3. Напишите формулу маслянокислого железа.
4. Почему для приготовления препарата, содержащего клостридии, жидкость необходимо отбирать со дна пробирки?

Лабораторная работа 11. Аммонифицирующие бактерии и уробактерии

Цель работы:

1. Изучить накопительную культуру почвенных бактерий-аммонификаторов;
2. Изучить накопительную культуру уробактерий.

Методические указания

Аммонифицирующие микроорганизмы широко распространены в природе. Для аммонификаторов характерно использование широкого круга органических соединений, в том числе сахаров, органических кислот, белков. Форм, приспособленных к использованию только белков, немного. Такие бактерии имеют протеазы и в процессе жизнедеятельности разлагают белки. При разложении белка микроорганизмами образуются аминокислоты, которые прокаротиоты используют при биосинтезе собственных белков. Часть аминокислот используется бродильщиками как субстрат для получения энергии. В результате анаэробного разложения аминокислот выделяются аммиак, углекислый газ и сероводород. К аммонификаторам относят, в основном, грамположительные споровые палочки рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megatherium*). Из бесспоровых форм в группу аммонификаторов входят представители родов *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*. Роль аммонифицирующих бактерий в природе огромна. Они являются деструкторами, осуществляя минерализацию белков.

Мочевину в окружающую среду выделяют млекопитающие и большинство наземных животных. Уробактерии разлагают мочевину с образованием углекислого газа и аммиака. В результате pH среды повышается до 9-10, значения, при котором уробактерии, в отличие от большинства микроорганизмов, хорошо растут. Уробактерии обитают в сточных водах, почве, навозе, моче. Представителями уробактерий являются *Sporosarcina ureae*, *Pasteurella urea* и *Actinobacillus ureae*.

Для выделения аммонифицирующих микроорганизмов из почвы используют питательный бульон. Выделяя уробактерии, со-

здают элективные условия, добавляя в питательный бульон моче-вину.

Практическое задание

Для получения культур аммонификаторов и уробактерии готовят питательные среды для аммонифицирующих микроорганизмов и уробактерий по прописям, представленным в приложении, и разливают по 50 мл в колбы вместимостью 100 мл. В питательные среды добавляют небольшое количество почвы. В колбах с питательной средой для уробактерий определяют рН с помощью индикаторной бумаги. Колбу с питательной средой для аммонификаторов снабжают влажной индикаторной полоской и полоской фильтровальной бумаги, смоченной ацетатом свинца. Полоски укрепляют ватно-марлевой пробкой таким образом, чтобы они не касались питательной среды. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и культивируют при температуре 28-30°C.

На занятии студенты получают колбы с культурами. В колбах с аммонификаторами студенты должны обратить внимание на изменение цвета индикаторной полоски и бумаги, смоченной ацетатом свинца. По изменению цвета судят о процессах, происходивших в культуральной жидкости. Студенты готовят препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный мазок культуры аммонификаторов. Отмечают морфологию и подвижность бактерий, зарисовывают и подписывают препарат. В мазке можно увидеть спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, мелкие подвижные палочки *Proteus*, кокки *Micrococcus*.

В колбах с культурой уробактерий студенты определяют рН среды с помощью индикаторной бумаги, по изменению кислотности среды судят о процессах, происходящих в колбах. Студенты готовят препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный мазок культуры уробактерий. Отмечают морфологию и подвижность бактерий, зарисовывают и подписывают препарат. В мазке можно увидеть *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae*.

В тетрадь студенты записывают изменения, происходящие в колбах и процессы, которые вызывают эти изменения, зарисовывают препараты и подписывают названия бактерий.

Контрольные вопросы к занятию

1. Какую роль играют аммонифицирующие бактерии и уробактерии в природе?
2. Как можно для приготовления препарата стерильно отобрать каплю из колбы? Для ответа на вопрос воспользуйтесь личным опытом, полученным на предыдущих занятиях.

Лабораторная работа 12. Исследование качества хлебопекарных дрожжей

Цель работы:

1. Определить подъемную силу дрожжей ускоренным методом;
2. Определить кислотность дрожжей;
3. Определить фермент инвертазу в биомассе дрожжей

Методические указания

Человек издавна использует дрожжи для хлебопечения. Уже в середине 19 века в России было более 50 дрожже-винокуренных заводов, на которых получали дрожжевую биомассу.

В наше время биомассу дрожжей выращивают на мелассе – отходе производства сахара из сахарной свеклы, содержащем сахарозу. Сахароза является дисахаридом, который не может транспортироваться через цитоплазматическую мембрану. Для вовлечения сахарозы в метаболизм дрожжи вырабатывают фермент инвертазу (сахаразу), которая расщепляет этот дисахарид на глюкозу и фруктозу.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, выпускаемые для хлебопечения, по органолептическим и физико-химическим качествам должны соответствовать определенным нормам, которые прописаны в ГОСТ 171-81. В таблице N представлены некоторые нормы физико-химических показателей дрожжей.

Таблица 1

Нормы физико-химических показателей хлебопекарных дрожжей (по ГОСТ 171-81)

Наименование показателя	норма
Влажность в день выработки, не более, %	75
Подъемная сила, мин, не более	70
Кислотность 100 г. дрожжей в пересчете на уксусную кислоту, в день выработки, мг, не более	120
Кислотность 100 г. Дрожжей в пересчете на уксусную кислоту, на 12-е сутки хранения при температуре от 0 до +4°C, мг, не более	300

Практическое задание

На занятии студенты работают попарно. Материал для исследования: биомасса брикетированных дрожжей различного срока хранения (свежие, 10-12 дней, свыше 12 дней хранения), сухие дрожжи и раствор фермента. Раствор фермента готовится перед занятием. Для этого сухие дрожжи растирают в ступке с трехкратным количеством кварцевого песка, прибавляют десятикратное количество воды и оставляют при 35°C. После этого смесь фильтруют через бумажный фильтр. Прозрачный фильтрат употребляют в качестве раствора сахаразы.

А) Определение подъемной силы дрожжей ускоренным методом (по ГОСТ 171-81)

Каждая пара студентов получает свое задание: разные дрожжи с различным сроком годности.

Методика эксперимента: на электронных весах взвесить 0,31 г дрожжей, перенести в фарфоровую чашку, прилить 4,8 мл 2,5% раствора хлорида натрия, нагретого до 35 °С, и тщательно перемешать шпателем или пестиком. К полученному раствору добавить 7 г муки, замешать тесто и придать ему форму шарика. Шарик опустить в стакан с 200 мл воды, нагретой до температуры 35 °С, и поместить в термостат с той же температурой. Отметить время, прошедшее с момента погружения шарика на дно стакана, до момента его всплывания. Время подъема шарика в минутах умножить на коэффициент 3,5, полученный эмпирически для определения подъемной силы.

Б) Определение кислотности дрожжей (по ГОСТ 171-81)

Студенты проводят опыт с теми же дрожжами, которые были выданы для опыта А.

Методика эксперимента: Взвесить 10 г. дрожжей, поместить в колбу вместимостью 100 мл, залить 50 мл дистиллированной воды и перемешать. Титровать 0,1 н. раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до розового окрашивания. При титровании колбу

необходимо непрерывно встряхивать для поддержания однородности суспензии.

Все результаты опытов А и Б студенты записывают на доске и в тетради, сравнивают и делают соответствующие выводы о соответствии дрожжей различного срока годности стандартам, а также о влиянии условий хранения дрожжей на их физико-химические показатели.

В) качественное определение фермента инвертазы

В пробирку налить 2 мл 6.5% раствора сахарозы, добавить 0,5 мл раствора фермента. Через 10 минут в пробирку добавить 3 мл раствора 8%-ного сульфата меди, 3 мл 3%-го раствора сегнетовой соли (двойной виннокислой соли калия-натрия) в 2 н. растворе гидроксида натрия, перемешать и поставить пробирку на 3 минуты в кипящую водяную баню. В качестве контроля взять пробирку, в которой вместо фермента добавлено 0,5 мл дистиллированной воды. Контрольную пробирку также поставить на 3 минуты в водяную баню.

Студенты должны отметить изменения, произошедшие в растворе, отметить цвет осадка, самостоятельно написать уравнение процесса, отметить отсутствие изменений в контрольном растворе, написать причину изменений в опытном и отсутствия изменений в контрольном растворе.

Контрольные вопросы к занятию

1. Какие энергетические процессы протекают в клетках дрожжей в анаэробных и аэробных условиях?
2. Что значит: дрожжи «поднимают» тесто?

Часть 2

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ДЛЯ БОЛЬШОГО СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПРАКТИКУМА

Описанные ниже работы предназначены для студентов, освоивших базовый курс микробиологии и имеющих основные навыки работы с микроорганизмами. Цель данных работ – научить студентов самостоятельно работать, уметь обобщать знания и применять их при решении новых задач, планировать эксперимент и правильно интерпретировать полученные результаты. Лабораторные работы рассчитаны на большой лабораторный практикум, когда занятия проходят по 4-6 академических часов подряд.

На лабораторных занятиях очень важно закрепить у студентов привычку, которая в дальнейшем пригодится, особенно, если они будут заниматься научной работой. Это привычка убирать за собой рабочее место и мыть посуду. Не менее важно, чтобы студенты хорошо усвоили правила безопасной работы с микроорганизмами и всегда дезинфицировали или отдавали на автоклавирувание отработанные материалы, прежде чем мыть лабораторную посуду. Эту привычку необходимо вырабатывать даже при работе с непатогенными микроорганизмами.

Тема 1. Изучение влияния различных факторов на кинетику роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Цели работы:

1. Научиться измерять основные кинетические параметры роста микроорганизмов на примере дрожжей.
2. Научиться оптимизировать состав питательной среды и условия культивирования для оптимального роста микроорганизмов на примере дрожжей.

Методические указания

1. Периодическое культивирование микроорганизмов

Знание кинетических параметров роста микроорганизмов является важным для правильного их культивирования в контро-

лируемых и управляемых условиях. Большое значение кинетике роста придается в промышленной микробиологии, где с помощью микроорганизмов получают различные вещества. Небольшие отклонения от основных параметров роста могут привести к уменьшению концентрации получаемого продукта и к экономическим потерям.

Различные субстраты одна и та же культура утилизирует с разной скоростью. Часто выбор компонентов и их концентрации для роста культуры происходит опытным путем. При этом большое значение имеет расчет кинетических параметров роста микроорганизмов.

Самым распространенным способом выращивания микроорганизмов на сегодняшний день остается периодическое культивирование. Оно состоит из нескольких стадий: посев микроорганизмов на питательную среду, размножение, съём культуры и выделение нужного продукта. В лабораторных условиях нередко случаи, когда периодическое культивирование заканчивается гибелью культуры.

Рост бактерий при периодическом культивировании подчиняется законам, графическое отображение которых называется кривой роста. Типичная кривая роста микроорганизмов представлена на рисунке 2.

Кривая роста представлена в полулогарифмических координатах. По оси абсцисс отложено время культивирования в минутах или часах, по оси ординат – $\ln(N/N(0))$, где $N(0)$ – начальное количество биомассы бактерий, N – количество биомассы бактерий в данное время культивирования.

Количество биомассы можно выражать в граммах (если бактериальные клетки отмывают, высушивают и взвешивают), единицах оптической плотности (если прирост биомассы определяют по изменению мутности суспензии), в количестве бактериальных клеток в 1 мл жидкости (если количество клеток в определенном объеме жидкости считают под микроскопом).

На кривой выделяют следующие фазы роста:

I – лаг-фаза. В этой фазе не происходит прироста биомассы, микроорганизмы адаптируются к новой питательной среде. Одной из причин появления лаг-фазы является пересев бактерий на субстрат, для утилизации которого требуется биосинтез индуцибельных ферментов. В качестве примера рассмотрим пересев *Escherichia coli* с питательной среды, содержащей глюкозу, на питательную среду с лактозой. Кишечные палочки начинают синтезировать β -галактозидазу, когда в питательной среде появляется лактоза. В это время, пока ферменты не синтезировались, кишечные палочки не могут утилизировать источник углерода, поэтому прироста биомассы не происходит. Еще одна причина, подробнее описанная ниже – пересев бактерий, находящихся в стационарной фазе роста. Лаг-фазы может не быть, если для пересевов культуры использовать только активные микроорганизмы и питательную среду одного и того же состава.

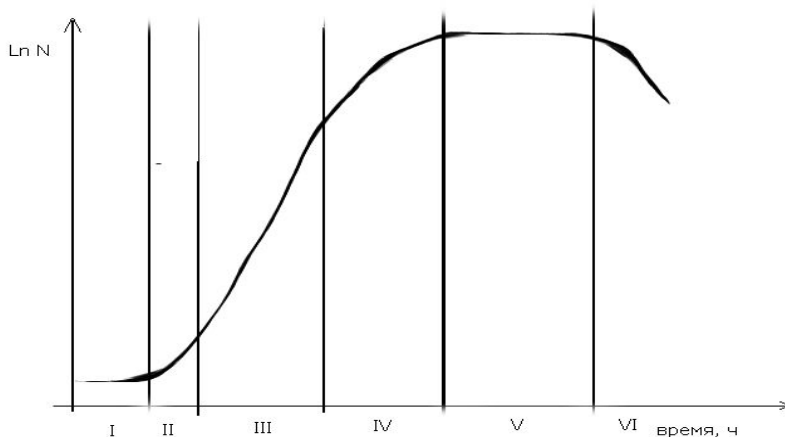


Рис.2. Кривая роста бактерий при периодическом культивировании. Условные обозначения: I, II, III, IV, V, VI – фазы роста (объяснение в тексте)

II – фаза ускоренного роста. В этой фазе происходит постепенное приспособление к питательной среде, постепенный

переход из неактивного состояния в состояние активного размножения.

III – лог-фаза. Фаза логарифмического роста. Ее также называют экспоненциальной фазой роста. В этой фазе микроорганизмы растут с максимальной скоростью, характерной для данной культуры на данном субстрате с данной концентрацией. В этих условиях, когда концентрация субстрата достаточна для роста, и в среде практически нет продуктов метаболизма, рост микроорганизмов описывается следующим уравнением:

$$dN/dt = \mu N \quad (1)$$

где dN – бесконечно малое приращение биомассы за бесконечно малый промежуток времени dt ; μ – удельная скорость роста, $ч^{-1}$; N – количество биомассы.

Это уравнение показывает, что чем больше биомассы N , тем больше будет ее приращение dN за небольшой промежуток времени dt . Разделив переменные, проинтегрировав обе части, получим:

$$\ln(N/N_0) = \mu t \quad (2)$$

где N – число клеток в данный момент времени; N_0 – начальное число клеток; t – время культивирования, ч.

Число клеток может выражаться оптической плотностью биомассы, либо количеством клеток, либо массой отмытых и высушенных клеток.

Анализ экспериментальных данных по исследованию кинетики роста клеточных популяций следует начинать в полулогарифмических координатах, когда по оси ординат откладывается $\ln N$, а по оси абсцисс – время, t . Если в этих координатах наблюдается спрямление экспериментальных данных, то они описываются уравнением (2). Тангенс угла наклона прямой равен удельной скорости роста культуры.

Удельная скорость роста является важной кинетической характеристикой культуры. Она характеризует рост данной культуры на данном субстрате и может являться одним из таксономических признаков. Другой, не менее важной характеристикой является

время удвоения (генерации) биомассы. Оно рассчитывается по формуле:

$$\tau_g = \ln 2 / \mu \quad (3)$$

IV – фаза замедленного роста. Ее также называют поздней экспоненциальной, либо ранней стационарной фазой. К этому времени в питательной среде постепенно исчерпывается субстрат, накапливаются продукты метаболизма. В начале фазы большая часть бактерий активно размножается, однако с течением времени, все больше бактерий переходит на метаболизм без размножения. Такой метаболизм позволяет тратить энергию только на поддержание жизнедеятельности клетки, следовательно, клетки потребляют меньше субстрата в единицу времени. Рост биомассы замедляется, что находит отображение на кривой роста.

V – стационарная фаза роста. В этой фазе не происходит заметного увеличения биомассы, но это не означает массовую гибель микроорганизмов. Часть клеток в этой фазе роста действительно погибает. Но примерно столько же клеток активно размножается (нередко, за счет гибнущих микроорганизмов). Большинство клеток переходят на метаболизм без размножения. Поэтому, когда культуру пересевают в стационарной фазе роста на свежую питательную среду, то рост микроорганизмов начинается с лаг-фазы, так как им требуется время для синтеза ферментов, участвующих в биосинтезе клеточных структур, то есть, перестроить свой метаболизм на размножение.

Не смотря на «энергосберегающий режим», на который переходят клетки, стационарная фаза не может длиться бесконечно. При полном исчерпании питательных веществ и накоплении продуктов метаболизма, часто являющихся токсичными для клеток, культура постепенно переходит в последнюю фазу роста.

VI – фаза отмирания. Постепенно в среде происходит лизис клеток, количество биомассы уменьшается. При этом увеличивается вязкость культуральной жидкости.

2. Краткая характеристика дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Дрожжи – микроскопические эукариотные организмы, которые относятся к аскомицетам и базидиомицетам. Сахаромицеты, широко используемые в бродильном производстве и хлебопечении, относятся к аскомицетам. Это грибы, не образующие мицелия, представляющие собой овальные клетки. Размножаются почкованием. В микроскопическом препарате легко отличить живые клетки от мертвых. Достаточно добавить в суспензию дрожжей каплю раствора метиленового синего. Живые клетки плохо окрашиваются красителем, когда как мертвые дрожжи окрашиваются в синий цвет.

Сахаромицеты – гетеротрофы. Основные источники углерода: глюкоза, фруктоза, сахароза. Источником азота могут служить соли аммония, аминокислоты.

В анаэробных условиях дрожжи осуществляют спиртовое брожение, в аэробных – дыхание. Однако в аэробных условиях при высокой концентрации глюкозы в питательной среде дрожжи переходят на брожение. Об этом необходимо помнить, если целью является получение биомассы: при брожении клетки получают меньше энергии, чем при дыхании, следовательно, размножаются с небольшой скоростью. При получении биомассы в дрожжевом производстве глюкозу добавляют в питательную среду постепенно, по мере увеличения дрожжевой биомассы, с таким расчетом, чтобы не было избытка источника углерода.

Экспериментальная часть

В данном задании изучается влияние на кинетику роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*:

- А) концентрации источника углерода;
- Б) концентрации источника азота;
- В) температуры;
- Г) начальной кислотности питательной среды;
- Д) степени доступности кислорода.

На каждом этапе выбирается оптимальный параметр фактора, который не изменяется в последующих экспериментах. Задача студентов: найти оптимальные параметры исследуемых факторов для роста дрожжей и обосновать их.

Студенты выполняют задачу группами по три человека.

Занятие 1

Подготовка к эксперименту по влиянию концентрации источников углерода и азота в среде на кинетику роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Приготовить питательные среды. Количество минеральных солей в питательных средах должно быть одинаковым (из расчета г/л H_2O): KH_2PO_4 – 1,0; KCl – 0,15; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,05. pH питательных сред должно быть равным 6. Питательная среда каждой пары студентов отличается по концентрации источников углерода и азота.

Первая среда: доля сахарозы в питательной среде составляет 1%, количество сульфата аммония рассчитывается исходя из правила, что соотношение углерода и азота в питательной среде равно 6.

Вторая среда: доля сахарозы в питательной среде составляет 2%, количество сульфата аммония рассчитывается исходя из правила, что соотношение углерода и азота в питательной среде равно 6.

Третья среда: доля сахарозы в питательной среде составляет 1%, сульфат аммония взвешивается в два раза больше, чем в первой среде.

Четвертая среда: доля сахарозы в питательной среде составляет 2%, сульфат аммония взвешивается в два раза больше, чем в третьей среде.

Питательные среды наливают по 150 мл в колбы объемом 250 мл, снабжают ватно-марлевыми пробками и отдают на автоклавирование при 0,5 атм.

Занятие 2

Провести опыт по кинетике роста дрожжей. Для этого взвесить по 30 мг дрожжей, стерильно поместить в колбы с питатель-

ными средами, размешать и стерильно отлить в пробирку 5 мл. Это будет нулевая проба, начало роста биомассы. Колбы поместить в термостат при температуре 30°C.

В дальнейшем пробы следует стерильно отбирать по 5 мл культуральной жидкости в пробирку каждые 0,5 ч. Прирост биомассы сопровождается увеличением мутности культуральной жидкости, которое можно регистрировать на фотоэлектроколориметре как изменение оптической плотности. Измерение оптической плотности проб следует проводить при 590 нм. При такой длине волны света оптическая плотность бесцветных и цветных жидкостей минимальна и практически не вносит вклад в изменение оптической плотности частиц, взвешенных в суспензии, каковыми являются дрожжи, растущие в культуральной жидкости. Результаты эксперимента записывать в тетрадь.

Для определения доли живых, мертвых и почкующихся клеток в суспензии дрожжей в момент отбора проб можно использовать следующую методику. В каплю суспензии дрожжей на предметном стекле внести каплю рабочего раствора метиленового синего, покрыть покровным стеклом и микроскопировать. При этом живые клетки очень слабо окрашиваются красителем, мертвые клетки становятся синего цвета. Почкующиеся клетки легко отличить от живых непочкующихся по четко видимому выросту (почке) на клетке. Для достоверности результата клетки следует считать не менее чем в 10 полях зрения.

Занятие 3

1. Математическая обработка результатов эксперимента. По полученным данным каждой группе студентов необходимо построить свою кривую роста. По результатам микроскопирования посчитать долю живых, почкующихся и мертвых клеток в суспензии дрожжей.

2. Построить кривую роста дрожжей, отложив по оси абсцисс время культивирования, по оси ординат – натуральный логарифм оптической плотности. Определить основные параметры роста культуры: удельную скорость роста и время генерации. На том же графике построить зависимость доли почкующихся клеток от

времени и доли мертвых клеток от времени. Провести сравнение графиков, построенных студентами для разных питательных сред, сделать выводы. Среди исследованных питательных сред найти наиболее пригодную для роста дрожжей.

3. Подготовиться к эксперименту по зависимости кинетики роста дрожжей от температуры. Для этого приготовить наиболее пригодную для роста дрожжей питательную среду и разлить по 150 мл в две колбы объемом 250 мл. Колбы закрыть ватно-марлевыми пробками и отдать на стерилизацию.

Занятие 4

Провести эксперимент по зависимости кинетики роста дрожжей от температуры по методике, предложенной в занятии 2, однако суспензию дрожжей в одной колбе культивировать при комнатной температуре, а в другой – при температуре 35°C в термостате.

Занятие 5

1. Обработать результаты математически. Найти оптимальную температуру роста дрожжей.

2. Подготовиться к эксперименту по зависимости кинетики роста дрожжей от pH. Для этого приготовить наиболее пригодную для роста дрожжей питательную среду и разлить по 150 мл в три колбы объемом 250 мл. Колбы закрыть ватно-марлевыми пробками и отдать на стерилизацию. Отдельно приготовить и простерилизовать 1 н. растворы соляной кислоты и гидроксида натрия. Перед экспериментом в первой колбе значение pH оставить неизменным, во второй колбе значение pH снизить на 2 единицы с помощью кислоты, в третьей колбе значение pH увеличить на 2 единицы-с помощью щелочи.

Занятие 6

1. Провести эксперимент по зависимости кинетики роста дрожжей от pH. Методика проведения эксперимента описана в занятии 2. Дрожжи культивировать при температуре, выбранной в предыдущем эксперименте.

Занятие 7

1. Обработать результаты математически. Найти оптимальное для роста дрожжей значение pH.

2. Подготовиться к эксперименту по зависимости кинетики роста дрожжей от доступности кислорода воздуха. Для этого приготовить наиболее пригодную для роста дрожжей питательную среду и разлить по 50 мл в колбы объемом 100 мл и 250 мл. Так как диаметры этих колб различаются, то площадь соприкосновения дрожжей с воздухом будет разной. Кроме того, колбы различаются по высоте столба культуральной жидкости, что влияет на растворимость кислорода в ней. pH среды должен быть оптимальным. Колбы закрыть ватно-марлевыми пробками и отдать на стерилизацию.

Занятие 8

Провести эксперимент по влиянию доступности кислорода на кинетику роста дрожжей. Методика проведения эксперимента описана в занятии 2. Дрожжи культивировать при температуре, выбранной в предыдущем эксперименте.

Занятие 9

1. Обработать результаты эксперимента. Сделать выводы о влиянии доступности кислорода воздуха на дрожжи.

1. Домашнее задание: оформить полный протокол исследования с результатами микроскопирования, графиками, расчетами, объяснениями, выводами.

Тема 2. Влияние бактерицидных веществ на различные виды бактерий

Цели работы:

1. Исследовать действие бактерицидных веществ на различные виды бактерий.
2. Научиться находить минимальную биоцидную концентрацию антисептиков.

Методические указания

Общая характеристика бактерицидных препаратов

Бактерицидные препараты – вещества, способные убивать бактерии. Некоторые из них способны убивать и другие микроорганизмы. К бактерицидным веществам относятся различные по химической природе соединения: фенол, сулема, спирт, формалин, перекись водорода, антибиотики, четвертичные аммониевые основания, хлорсодержащие вещества; из газов — сернистый газ, окись этилена, бромистый метил и другие. Под действием бактерицидных веществ вегетативные клетки погибают быстро, однако гибели спор добиться труднее.

Механизм действия бактерицидных препаратов на бактерии различен: денатурация белка микробной клетки, поражение определенных ферментных систем и т. д. Чувствительность различных видов микроорганизмов к таким препаратам также неодинакова. Менее подвержены бактерицидному действию бактерии, образующие скопления, объединенные полисахаридом или белково-полисахаридным комплексом (например, бактерии в биопленках), более – одиночные клетки, не образующие полисахариды. В присутствии белков (гной, сыворотка, молоко и др.) активность бактерицидных средств снижается. Многие материалы адсорбируют биоциды, снижая их концентрацию, и, как следствие, активность.

Бактерицидные препараты по своему назначению различны. Одни из них используются в качестве стерилизующих агентов, другие – как дезинфицирующие средства, которые значительно уменьшают количество микроорганизмов в объекте, но не элиминируют их полностью.

Различают дезинфектанты, антисептики и антибиотики. Дезинфектанты предназначены для обработки помещений и оборудования; антисептики – для обработки живых тканей; антибиотики – для лечения инфекционных заболеваний человека. Дезинфектанты и антисептики не предназначены для приема внутрь, так как часто применяются в концентрациях, которые являются токсичными для организма человека. Концентрация применяемого бактерицидного средства зависит от его химической природы.

Основными качествами бактерицидов должны быть: широкий спектр действия, низкая рабочая концентрация, безопасность для человека и окружающей среды и низкая стоимость. Безусловно, практически нет препаратов, которые бы полностью удовлетворяли этим требованиям. Ниже приведены препараты, широко используемые как эффективные дезинфектанты и антисептики.

Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) – современные дезинфицирующие средства, которые обладают почти всеми вышеперечисленными достоинствами: хорошая смачивающая способность, очень высокая стабильность, отсутствие коррозионного эффекта, отсутствие запаха, возможность многократного применения рабочих растворов. Они обладают широким спектром антимикробной активности при низких концентрациях и температурах, однако не являются спороцидами. Некоторые из этих соединений не обладают биоцидной активностью против микобактерий туберкулеза. После высыхания ЧАС образуют на поверхности тонкую пленку, препятствующую оседанию микроорганизмов. Однако после дезинфекции оборудования пищевой промышленности ЧАС можно легко удалить с поверхностей водой. Очень важной характеристикой ЧАС является их безопасность для людей. Поэтому с этими дезинфицирующими средствами можно безопасно работать, их можно использовать в пищевой промышленности. Одними из самых эффективных ЧАС считаются средства на основе полигуанидинов.

В отличие от ЧАС хлорсодержащие соединения обладают рядом недостатков. Из-за содержания активного хлора, который быстро улетучивается, такие дезинфицирующие средства нестойки,

и в течение нескольких дней теряют свои бактерицидные свойства. На эффективность хлорных соединений большое влияние оказывает длительность воздействия. Эффективность хлорсодержащих дезинфицирующих средств повышается при увеличении температуры, так как при этом повышается активность хлора. И, хотя эти средства можно применять при температурах от +10 до +50°C, при +10°C дезинфицирующий эффект значительно меньше, чем при +50°C. Кроме того, дезинфицирующее средство на основе хлора может разрушать металлические поверхности, причем этот эффект усиливается с ростом температуры. Поэтому раствор, нагретый выше +50 градусов, обычно не применяется. Существенными недостатками является резкий запах, и опасность при попадании этих соединений в окружающую среду. В частности, они рассматриваются как один из основных первоисточников образования чрезвычайно опасного класса токсичных соединений – диоксинов. Достоинствами хлорсодержащих средств являются их доступность, низкая цена и высокая бактерицидная активность.

Более стойкими по сравнению с хлорсодержащими бактерицидными средствами являются дезинфектанты на основе хлораминов: готовые растворы могут храниться до 15 суток. Хлорамины могут оказывать спороцидное действие. Однако для этого их надо активировать хлоридом, сульфатом или нитратом аммония в соотношении к активному хлору 1:1. Такие растворы надо немедленно использовать, что является их недостатком. Недостатками являются резкий запах и опасность для персонала, работающего с хлораминами. Дыхательные пути и слизистые оболочки глаз лиц, занятых приготовлением и работой с этими растворами, должны быть защищены.

По сравнению с хлораминами, йодофоры являются более высокоэффективными антисептическими средствами, стабильными при длительном хранении. Однако они менее активны в отношении мицелиальных грибов и спор бактерий. Препараты представляют собой комплекс йода с соединением, замедляющим его выделение, и тем самым увеличивающим его эффективность за счет более продолжительного действия по сравнению со спиртовым раство-

ром йода. Йод является сильным окислителем, однако его антисептическое действие обусловлено не окислением, а галогенизированием белков бактерий. Современные йодофоры являются высокоэффективными средствами при профилактике и лечении гнойно-воспалительных процессов в клинической практике. Они хорошо переносятся больными. Йодофоры широко применяются при дезинфекции оборудования в пивоваренной промышленности. Их используют для обработки сосков коров при дойке. Аквариумисты используют йодофоры для дезинфекции аквариумов. Самым известным йодофором является повидон-йод – комплекс йода с поливинилпирролидоном.

Спирты обезвоживают, денатурируют белки бактерий. Однако они не действуют на бактериальные споры и неэффективны против *Mycobacterium tuberculosis*. Бактерицидные свойства спиртов улучшаются с увеличением молекулярного веса. Так, наименее эффективным бактерицидным агентом является метиловый спирт, наиболее эффективен амиловый спирт. Но наиболее предпочтительным является этиловый спирт, так как он является самым нетоксичным из спиртов, применяемых в дезинфекции. Оптимальная дезинфицирующая концентрация этилового спирта 70%. При более высокой концентрации спирта белки бактерий денатурируют быстро, разрушенные белковые каналы препятствуют дальнейшему проникновению спирта внутрь клетки. Эффективность спиртов увеличивается также с увеличением температуры.

Фенолы являются эффективными дезинфектантами. Спор не убивают. Фенол не применяют на практике, так как он токсичен, обладает канцерогенным действием. Однако его производные (резорцин, тимол, хлорофен) находят применение в медицине.

Перекись (или пероксид) водорода используется в виде 3%-ного раствора. Антисептическое средство из группы оксидантов. При контакте перекиси водорода с поврежденной кожей или слизистыми оболочками высвобождается активный кислород, при этом происходит инаktivация (окисление) органических веществ (протеины, кровь, гной), в том числе, и компонентов бактериальных клеток. Она обладает такими ценными качествами, как отсут-

ствие запаха, быстрое разложение во внешней среде на нетоксичные продукты, отсутствие аллергенного действия. Однако перекись водорода не очень стабильна, производит выраженное местнораздражающее действие и, по сравнению с другими дезинфектантами, имеет низкую бактерицидную активность.

Экспериментальная часть

Студенты проводят лабораторную работу по 2 человека.

Занятие 1. Подготовка к эксперименту.

Студенты обсуждают с преподавателем антисептики и бактерии, которые будут использовать в работе. Обсуждается концентрация антисептиков и бактерий.

Студенты готовят к стерилизации пробирки с 5 мл бульона. Количество пробирок соответствует числу и количеству концентраций антисептиков и видов бактерий. Каждая пара студентов использует один вид бактерий и несколько антисептиков, либо один антисептик и несколько видов бактерий.

Рекомендуемое последовательное разведение антисептиков – 2-кратное, бактерий – 10-кратное.

Антисептики следует разводить в воде и добавлять в питательную среду. Целесообразно использовать не более 5 различных концентраций антисептиков. Разведение и последующее культивирование бактерий осуществляется в пробирках с бульоном.

Расчет необходимых пробирок нужно произвести, предварительно ознакомившись с описанием занятия 2. Для стерилизации также необходимо приготовить пипетки, количество которых рассчитывается, исходя из количества опытов, необходимости разведения антисептиков и бактерий. Рассчитывается и готовится к стерилизации число пробирок с водопроводной водой, необходимое для разведения антисептиков. Все расчеты студенты проводят самостоятельно и обсуждают результаты с преподавателем.

Занятие 2.

Для разведения бактерий в отдельной пробирке с бульоном необходимо получить суспензию бактерий с мутностью, соответ-

ствующей 10^6 - 10^9 кл/мл. В пробирки с бульоном добавить по 0,1 мл полученной суспензии. Если студенты получают задание с разными видами бактерий, то для каждого вида используется по 5 пробирок с бульоном. Если студенты получают задание с одним видом бактерий, то используют для посева одного вида 10 пробирок с бульоном. В засеянные пробирки добавляются антисептики в различных концентрациях. Студенты, работающие с разными видами бактерий, проводят два параллельных опыта с пятью концентрациями одного и того же антисептика. Студенты, работающие с одним видом микроорганизмов, проводят опыты с пятью концентрациями двух антисептиков. После окончания работы пробирки подписываются и инкубируются в течение 1-2 суток при 30°C. На следующем занятии необходимо определить количество выживших бактерий в каждой пробирке. Для этого каждая пара студентов на этом же занятии готовит 10 пробирок с 15 мл питательного агара, заворачивает 10 чашек Петри, 10 пипеток объемом 1 мл и отдает на стерилизацию.

Занятие 3.

Студенты получают пробирки с культурами, чашки Петри, пипетки и пробирки с питательным агаром. Питательный агар расплавляют на водяной бане. Из каждой пробирки переносят по 1 мл суспензии в чашки Петри. 10 чашек Петри должны соответствовать 10 пробиркам. Расплавленный агар остужают до 55-60°C и заливают в чашки Петри. Чашки подписывают и инкубируют при 30 °C.

Занятие 4

Студенты считают колонии в чашках Петри, по их количеству делают выводы о биоцидной концентрации антисептиков и о причинах устойчивости разных видов бактерий к одним и тем же антисептикам. Оформляют работу и пишут выводы.

Тема 3. Действие лекарственных трав на бактерии

Цели работы:

1. Исследовать бактерицидное действие отваров лекарственных растений
2. Исследовать бактерицидное действие водных настоев лекарственных растений
3. Исследовать бактерицидное действие спиртовых отваров лекарственных растений.
4. Сделать выводы об эффективности лекарственных трав.

Методические указания:

Для лечения заболеваний часто в составе комплексной терапии используют лекарственные растения. Применяются отвары, настои, водные и спиртовые растворы таких растений как подорожник, календула, ромашка и др. В отличие от антибиотиков, обычно бактерии не проверяют на чувствительность к этим препаратам.

Экспериментальная часть

Занятие 1

Студенты выполняют работу по 2-3 человека. Перед началом работы каждая группа студентов обсуждает с преподавателем выбор растения и микроорганизмов для опытов, количество опытов. Каждая подгруппа студентов выбирает не только травы, из которых будут готовить настои, но и спиртовой раствор лекарственных растений. Микроорганизмы выбирают из коллекции, имеющейся в лаборатории. Студенты знакомятся с основными свойствами выбранных культур. В каждом эксперименте студенты проводят троекратные опыты. При применении спиртового раствора лекарственных трав необходим контроль: этиловый спирт, концентрация которого будет такой же, как в спиртовом растворе растения. Исходя из количества опытов, студенты должны рассчитать необходимое количество чашек Петри (один опыт – одна чашка Петри).

Каждой подгруппе необходимо рассчитать необходимое количество пипеток объемом 1 мл. Пипетки необходимы для нанесения 0,1 мл суспензии микроорганизмов на поверхность питательного агара (одна пипетка используется в одном опыте), а также для внесения одной капли отвара, спиртового настоя трав, либо спирта в чашку Петри (одна пипетка на три опыта в эксперименте).

Студенты готовят необходимое количество питательного агара, исходя из того, что 100 мл питательной среды можно разлить по 6 пробиркам высотой в 2/3 пробирки, питательная среда из одной пробирки после стерилизации переносится в одну чашку Петри. Заворачивают чашки Петри, пипетки. Каждая подгруппа готовит пробирку с 5 мл воды, снабженную ватно-марлевой пробкой.

Занятие 2

Проведение эксперимента. Каждая подгруппа студентов получает стерильные питательные среды, чашки Петри, пипетки, пробирки с водой, культуры на агаровых сколах.

Студенты готовят настои трав так, как они готовятся в домашних условиях: две столовые ложки измельченного сырья заливают кипящей водой, накрывают сосуд и выдерживают 15 минут. Затем настой фильтруют.

Питательный агар расплавляют в водяной бане на плитке, стерильно заливают в чашки Петри (одна пробирка агара – одна чашка Петри), ждут, когда питательная среда застынет.

За это время готовят суспензию микроорганизмов, стерильно перенося бактерии со скошенной поверхности питательного агара в пробирку с 5 мл воды. Для этого над пламенем горелки часть воды из пробирки наливают в пробирку с бактериями. Пробирки закрывают пробками, ставят пробирку с водой в штатив. Микробиологической петлей стерильно соскабливают бактерии в воду. Затем, снова взяв пробирку с водой, стерильно, над пламенем горелки переливают в нее воду с микроорганизмами из пробирки с агаром. Пробирки закрывают пробками. Суспензия готова.

На поверхность среды наносят 0,1 мл суспензии микроорганизмов. Стекланный шпатель фламбируют (прокаливают) в пламе-

ни горелки, остужают и приоткрытую крышку чашки Петри. Стерильным остуженным шпателем, легко касаясь поверхности среды, суспензию равномерно распределяют по агару. Пробкорез фламбируют в пламени горелки, остужают и приоткрытую крышку чашки Петри и стерильно вырезают посередине питательной среды столбик агара диаметром до 1 см. Пипеткой стерильно вносят в лунку, в зависимости от эксперимента, одну каплю отвара, спиртового раствора либо спирта. 96%-й этиловый спирт разводят до концентрации, применяемой в спиртовых растворах трав.

Каждый эксперимент проводится в трехкратных повторностях. Чашки Петри ставят в термостат и культивируют при температуре 28-30°C в течение 24-48 часов.

Занятие 3.

Студенты получают чашки Петри. В каждой чашке фиксируют отсутствие зоны подавления роста микроорганизмов либо измеряют в миллиметрах диаметр кольца зоны подавления роста бактерий. Данные трех опытов в каждом эксперименте усредняют. Усредненные результаты сравнивают между собой, делают вывод о том, какие лекарственные растения и в каком виде наиболее эффективны против микроорганизмов. Преподавателю сдают оформленный протокол работы с выводами об эффективности лекарственных трав.

Тема 4. Действие антибиотиков на бактерии

Цели работы:

1. Научиться ставить эксперименты по антибиотикочувствительности бактерий.

Методические указания

Антибиотики и антибиотикотерапия

Антибиотики – низкомолекулярные соединения природного происхождения, либо полученные путем химического синтеза, вызывающие гибель или подавляющие рост других организмов, В большинстве случаев этими организмами являются прокариоты и простейшие. Вирусы не являются мишенями для антибиотиков.

В настоящее время выделено около 10 000 антибиотических соединений, но только несколько сотен из них стали широко применяться в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности. Причина в том, что большинство выделенных антибиотиков малоэффективны, токсичны для человека, неустойчивы, либо их крупномасштабное производство слишком дорого.

Основные требования к антибиотикам – активность против широкого спектра микроорганизмов и минимальная токсичность для человека. Одними из главных характеристик антибиотиков являются минимальная ингибирующая концентрация и минимальная летальная доза. Антимикробные препараты, используемые в медицине, получают разными способами. Природные антибиотики, в основном, получают с помощью прокариот рода *Streptomyces* и мицелиальных грибов. Синтетические получают путем химического синтеза. Полусинтетические антибиотики получают путем микробного синтеза, а затем химически модифицируют.

Антибиотики можно разделить на группы по действию на специфические бактериальные мишени и по химическому строению.

По действию на бактериальные мишени различают:

- антибиотики, блокирующие синтез муреина, входящего в состав клеточной стенки бактерий. К ним относятся β -лактамы (пенициллины, цефалоспорины), гликопептидные

антибиотики (ванкомицин). Так как муреин, содержащий d-аминокислоты, в клетках эукариот не встречается, данные препараты не действуют на клеточные структуры человека. В клеточной стенке грамположительных бактерий муреина содержится приблизительно в 40 раз больше, чем у грамотрицательных микроорганизмов, поэтому антибиотики этой группы, в основном, эффективны против грамположительных бактерий.

- антибиотики, блокирующие синтез бактериального белка. Эти препараты специфичны в отношении 70S-рибосом, которые, как известно, характерны только для прокариот. Тем не менее, несмотря на то, что в клетках эукариот имеются только 80S-рибосомы, в некоторой степени такие антибиотики подавляют трансляцию в митохондриях и хлоропластах. К ним относятся тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин, стрептомицин.
- антибиотики, подавляющие синтез нуклеиновых кислот. Одни антибиотики подавляют синтез РНК, не затрагивая ДНК. К ним относятся актиномицины. Другие ингибируют синтез ДНК, не затрагивая РНК. Это митомицины, рубомицин, новобиоцин. Примечательно, что антибиотики этой группы тормозят синтез РНК или ДНК в опухолевых клетках.
- антибиотики, нарушающие функцию мембран. Среди них вещества, вызывающие изменение проницаемости мембран и потерю клеткой важных метаболитов (грамицидин, полимиксин). Ряд антибиотиков ингибируют транспортные белки (олигомицин). В эту группу также входят антибиотики-ионофоры, индуцирующие проницаемость ионов через мембрану клеток (валиномицин). Некоторые антибиотики отрицательно действуют на трансмембранный потенциал. К ним относится полимиксин, ванкомицин.
- антибиотики, ингибирующие ферменты. В эту группу входят ингибиторы ферментов дыхания (антиметицины), окислительного фосфорилирования (валиномицин).

- антибиотики-метаболиты. Эти вещества являются антагонистами некоторых аминокислот и витаминов. Это циклосерин, пурамицин и др.

По химическому строению различают:

- аминогликозиды – антибиотики, имеющие гликозидные связи. Это стрептомицин, гентамицины. Основной недостаток – высокая токсичность.
- β -лактамы антибиотики. К ним относятся пенициллины, цефалоспорины. К β -лактамам антибиотикам относят карбапенемы с широким спектром действия
- Тетрациклины. Содержат четыре конденсированных бензольных кольца. К ним относят хлортетрациклин, окситетрациклин, метациклин и др. В основном оказывают бактериостатическое действие.
- Макролиды. Представляют собой макроциклическое лактонное кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками. К ним относят эритромицин, олеандомицин и др. Обладают бактериостатическим действием. Среди этой группы антибиотиков есть соединения, активные против грибов, но практически не действующие на бактерии. Таким антибиотиком является филиппин.
- Хромопептиды. В состав этих соединений входят хромофорная группировка и два пентапептида. Разнообразие этой группы определяется варьированием аминокислотного состава пептидов. К антибиотикам этой группы относят актиномицины.
- Анзамицины. Соединения содержат ароматическую группу и алифатическую цепь. Среди них рифамицин, рифампицин, новобиоцин.
- Гликопептидные антибиотики. Это гликозилированные циклические или полициклические нерибосомные пептиды.

Одним из недостатков антибиотиков является появление у бактерий резистентности к ним. Резистентность к различным антибиотикам может проявляться по-разному.

- Резистентные к пенициллину микроорганизмы продуцируют пенициллиназу, фермент, который осуществляет гидролиз пенициллина. Образовавшиеся алифатическая и ароматическая части не обладают антибиотической активностью.
- Резистентные к аминогликозидам бактерии ацетируют, фосфорилируют или аденилируют антибиотики, делая их неактивными. Для этого микроорганизмы продуцируют специфические ферменты.
- Микроорганизмы, резистентные к тетрациклинам, синтезируют транспортные мембранные белки, которые специфичны к этим антибиотикам и выводят их из клетки, прежде чем те начнут активно взаимодействовать с рибосомами.
- Против эритромицина бактерии синтезируют ферменты, катализирующие метилирование 23S рибосомальной РНК. Такие рибосомы не могут связывать антибиотик.
- Резистентные к триметоприму мутанты синтезируют нечувствительную к этому антибиотику гидрофолатредуктазу — фермент, участвующий в метаболизме витамина тетрагидрофолиевой кислоты.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам является большой проблемой медицины. Дело в том, что микроорганизмы способны передавать гены, ответственные за антибиотическую резистентность, с помощью конъюгативных плазмид, причем, не только в пределах одного вида и рода.

Эта проблема заставляет постоянно заниматься поисками новых антибиотиков. Можно химически модифицировать природные антибиотики, получая полусинтетические. Химически модифицированные антибиотики также можно получить, изменяя генетические свойства их продуцентов. Так как обычно для синтеза антибиотиков используются не один, а несколько ферментов, то, изменяя на генетическом уровне свойство одного из ферментов, можно получить антибиотик с небольшими изменениями в химическом составе. Однако устойчивость бактерий к таким антибиотикам развивается быстрее, чем к новым. Поэтому предпочтительней поиск новых антибактериальных веществ.

В настоящее время известны новые антибиотики из липопептидов, липогликопептидов, оксазолидонов. Часть из них химически синтезирована. Но встречаются также полусинтетические и природные антибиотики. К новым антимикробным препаратам относятся, например, линезолид, даптомицин, телаванцин, далбаванцин.

До недавнего времени продуценты антибиотиков искали в той же среде обитания, в которой живет большинство патогенов. Возможно, что одной из причин быстрого вырабатывания резистентности является то, что в своей среде обитания продуценты выделяют те же антибиотики, какие получает с помощью них человек, только в гораздо меньшей концентрации. Другой причиной быстрой приспособляемости к антибиотикам патогенов является то, что продуценты имеют гены, ответственные за резистентность к собственному антибиотику. Эти гены можно передать другим бактериям с помощью плазмид. Таким является штамм стрептомицетов, продуцирующий ванкомицин. Исследователи считают, что продуцентов новых антибиотиков среди почвенных микроорганизмов нет.

Поэтому современные исследователи осуществляют поиски продуцентов в других экологических нишах, например, в глубинах морей и океанов. Поиски также ведутся среди симбионтов, которые выделяют вещества, уничтожающие конкурентов, но не партнера. Такими являются грибы или актиномицеты – симбионты насекомых. Еще одна стратегия, на сегодняшний день кажущаяся почти фантастической – поиск антибиотиков, «специализирующихся» на конкретных видах бактерий. Тогда, даже при развитии у бактерий устойчивости к антибиотикам, передача генов резистентности другим видам бактерий будет бесполезна. Антибиотики строго специфического действия также позволили бы сохранить на фоне лечения инфекций нормальную микрофлору человека. Наряду с поиском новых антибиотиков ученые ищут другие пути обезвреживания патогенов. Один из них – пептидные трубки, встраиваемые в мембрану бактерий, которые разрушают клеточную стенку бактерий. Другой способ – блокирование генов, ответственных за

синтез известных факторов патогенности. Ученые считают, что лишенные вирулентности бактерии можно будет оставлять в живых. У таких бактерий резистентность к терапии будет возникать позже, чем при лечении антибиотиками. Еще один интересный путь – применение противoadгезивных препаратов. Этот путь особенно эффективен для бактерий, вызывающих кишечные инфекции, так как они прикрепляются к стенкам кишечника. Одним из перспективных направлений является вмешательство в систему межклеточных коммуникаций. Некоторые патогенные бактерии образуют в организме биопленки, в которых клетки окружены слизью. Для формирования биопленок клетки продуцируют и улавливают сигнальные молекулы. «призывающие» их к объединению. В таких биопленках слизь затрудняет диффузию антибиотиков к клеткам. Компоненты биопленок могут посылать сигналы тревоги при приближении иммунных клеток, на что биопленки реагируют образованием пептидов, уничтожающих клетки иммунной системы. Блокирование синтеза сигнальных молекул или их химическая модификация не дадут одиночным клеткам собраться. В результате либо сам организм сможет справиться с ними, либо для уничтожения патогенов потребуются более низкие концентрации антибиотиков.

Альтернативные методы лечения инфекционных болезней весьма перспективны. Некоторые вещества, влияющие на адгезивные свойства бактерий, клеточные процессы коммуникации, выработку токсинов и т.д., уже прошли доклинические испытания. Однако, несмотря на недостатки, антибиотики еще долго будут одними из основных средств борьбы с патогенными микроорганизмами.

Экспериментальная часть

Студенты выполняют задание небольшими группами по 2-3 человека.

Занятие 1.

Студенты обсуждают с преподавателем выбор микроорганизмов, кратность и количество разведений антибиотиков. Самая высокая концентрация антибиотика рассчитывается по его тера-

певтической дозе. Обычно первые несколько разведений антибиотиков десятикратные. Следующие разведения обычно двукратные. По количеству разведений студенты готовят необходимое число пробирок с рассчитанным объемом воды. Студенты обсуждают количество пробирок и объем питательной среды, которые потребуются для получения бактериальной суспензии. Количество пробирок должно соответствовать количеству разведений антибиотиков.

Студенты готовят питательную среду, разливают в пробирки. Объем питательной среды в пробирке рассчитывается таким образом, чтобы после разведения суспензии можно было отлить 3 мл жидкости для измерения оптической плотности на ФЭКе. Отдельно готовят воду для переноса бактерий с твердой питательной среды. Все пробирки снабжают ватно-марлевыми пробками. Считают количество пипеток, необходимое для разведения антибиотиков, для разведения суспензии микроорганизмов в питательной среде и для переноса антибиотиков в среду с бактериями. Пипетки заворачивают. Приготовленную посуду, воду и питательную среду отдают на стерилизацию.

Занятие 2

Студенты получают простерилизованные материалы, одноразовые шприцы, объем которых заранее обсуждают с преподавателем, флакон с антибиотиком. С преподавателем обсуждается вопрос об объеме раствора антибиотика.

В стерильных условиях из первой пробирки одноразовым шприцом отбирают определенный объем воды, вносят во флакон, растворяют антибиотик, одноразовым шприцом отбирают раствор из флакона и переносят обратно в пробирку. Стерильно готовят серию разведений антибиотиков. Пробирки с разведенными антибиотиками пронумеровывают. В пробирке с водой разводят суспензию микроорганизмов, стерильно перенося ее с агарового скоса. Пипетками стерильно добавляют в пробирки с питательной средой определенный одинаковый объем суспензии. Перемешивают, пробирки пронумеровывают, стерильно добавляют из каждой пробирки антибиотик в пробирку с соответствующим номером. Снова хорошо перемешивают, стерильно отливают по 3 мл жидкости и из-

меряют оптическую плотность на ФЭКе, результат заносят в тетрадь. Жидкость после измерений сливают в чистые колбочки, снабжают ватно-марлевой пробкой и отдают на автоклавирувание. Пробирки с суспензией и антибиотиком ставят в термостат на 24-48 часов.

Занятие 3

Студенты получают пробирки, измеряют оптическую плотность культуральной жидкости в каждой пробирке, сравнивают с результатами, полученными на предыдущем занятии. По изменению оптической плотности делают выводы о бактерицидной концентрации антибиотика, учитывая разведение в пробирках с питательной средой и микроорганизмами. Работу оформляют и сдают преподавателю. Пробирки отдают на стерилизацию, затем моют. Отработанную посуду дезинфицируют и моют.

Тема 5. Влияние различных факторов на инактивацию антибиотиков

Цели работы:

1. Изучить физические способы инактивации антибиотиков.
2. Изучить химические способы инактивации антибиотиков.

Методические указания

Лекарственные формы антибиотиков имеют свой срок годности, по истечении которого их необходимо выбрасывать. Но делать это следует так, чтобы не увеличивать в окружающей среде количества микроорганизмов, устойчивых к этим лекарственным препаратам.

Можно проводить предварительную инактивацию антибиотиков, добавляя к ним 10%-й раствор натрия гидроксида в количестве 10% от объема раствора лекарства, выдерживая в течение 2 недель, а затем, нейтрализуя до pH 5,0-7,0, как, например, предписывают в Белоруссии. Однако зачастую предлагается разводить антибиотики водой в соотношении 1:100 и выливать в канализацию.

Инактивировать антибиотики можно за несколько минут в кислой (pH = 1-2,5) или щелочной (pH = 8-9) среде. Так, например, инактивируются тетрациклины.

Направленная инактивация антибиотиков – процесс малоизученный. Поэтому в данной работе студентам предлагается проводить эксперименты не только вышеописанными, но придуманными ими способами. Большое значение имеет низкая стоимость эксперимента и небольшие временные затраты при проведении экспериментов.

Задача студентов – ознакомиться с химическим строением антибиотиков, аргументировано предложить вещества, могущие вызвать инактивацию антибиотиков.

Роль преподавателя в данной работе – на занятии, предшествующем эксперименту, ознакомить студентов с задачей, участвовать в обсуждении экспериментов, помочь студентам выбрать из числа предложенных методов наиболее безопасные.

Экспериментальная часть

Студенты выполняют задание в группах по 2-3 человека.

Эксперимент по изучению антагонистической активности антибиотиков проводится аналогично опыту, описанному в теме 4. Однако, прежде чем приступить к обсуждению эксперимента, студенты обсуждают с преподавателем вещества и способы инактивации антибиотиков. На первом занятии проводят инактивацию антибиотиков. Стерильным шприцем во флакон добавляют раствор, который был выбран в ходе обсуждения, либо воздействуют физическими факторами. В качестве контроля используют неинактивированный антибиотик. Далее студенты проводят эксперименты так, как описано в теме 4.

Тема 6. Изучение антагонистического влияния стрептомицетов на почвенные бактерии

Цели работы:

1. Научиться выделять из почвы и идентифицировать стрептомицеты.
2. Закрепить навыки выделения из почвы и идентификации до рода чистых культур микроорганизмов.
3. Закрепить навыки определения метаболических особенностей микроорганизмов.
4. Научиться ставить эксперименты по антагонизму прокариот.

Методические указания

1. Антагонизм прокариот

Антагонизм – это конкурентные взаимоотношения между живыми существами. Микроорганизмы могут конкурировать за источники энергии и питания, за местообитание и т.д.

Явление антагонизма распространено в природе; микробы-антагонисты встречаются в различных субстратах, но больше всего их в почве, иле, торфе, навозе, компостах, остатках растений и животных. Например, в 1г подзолистых почв насчитывается до 800 тысяч микробов-антагонистов. Почвенные антагонисты регулируют состав микрофлоры почвы. Антагонизм широко распространен среди различных групп микроорганизмов: бактерий, актиномицетов, грибов, водорослей и др.

Микроорганизмы могут проявлять антагонистические свойства по отношению к микроорганизмам разных групп, определённым видам внутри группы, а иногда к штаммам одного вида [24].

Все формы микробного антагонизма можно объединить в две основные группы: пассивный и активный антагонизм.

Сущность пассивного антагонизма состоит в том, что угнетение роста одного вида микроорганизма другим может происходить только при определенных, иногда крайне ограниченных условиях развития этих организмов. Такие условия могут иметь место лишь при лабораторном культивировании. В обычных естествен-

ных условиях роста подобного проявления антагонизма, как правило, не бывает.

При активном антагонизме один вид микроорганизмов угнетает рост или полностью подавляет жизнедеятельность другого, выделяя в окружающую среду метаболиты, такие как органические кислоты, антибиотики.

Виды и штаммы микробов-антагонистов сильно различаются по степени антибиотической активности, которая зависит от множества внешних факторов: климата, растительного покрова, температуры, влажности воздуха, типа почвы, её кислотности и др. В то же время в природе антибиотики образуются нестабильно и в небольших концентрациях. Различают антагонизм явный, когда способность микроорганизма продуцировать антибиотики проявляется независимо от присутствия других микробов, и антагонизм вынужденный, когда эта способность проявляется только в присутствии других организмов, то есть, в условиях смешанных популяций.

Среди прокариот активными антагонистами являются актиномицеты, некоторые виды которых используются в промышленной микробиологии для получения антибиотиков.

Среди грибов наиболее активными продуцентами антибиотиков являются представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Alternaria*, *Fusarium*, многие виды деструктивных и других грибов из класса базидиомицетов, некоторые аскомицеты и мукоровые.

Под влиянием антагонистов у патогенных микробов изменяются форма и величина колоний и клеток, либо нарушаются процессы роста, развития, размножения; у грибов часто наблюдаются распад гиф, лизис мицелия. Нарушаются также синтез жизненно важных соединений, энергетический метаболизм, деятельность ферментных систем. Воздействие антагонистов может привести к мутациям.

Проявление антагонистических свойств микроорганизмов в лабораторных условиях зависит не только от свойств самих орга-

низмов, но и от условий культивирования, например, от состава питательной среды.

2.Краткая характеристика стрептомицетов

Стрептомицеты – грамположительные почвенные бактерии, относящиеся к актиномицетам. Запах свежевспаханной почвы весной обусловлен запахом стрептомицетов. Для них характерен рост в виде ветвящегося мицелия, который не распадается в процессе жизнедеятельности культуры. Гифы мицелия стрептомицетов по толщине сопоставимы с толщиной микроорганизмов рода *Bacterium*. Стрептомицеты хорошо растут на питательном агаре, который пригоден для роста многих почвенных бактерий. Однако из почвы их выделяют на специализированные питательные среды для стрептомицетов, на которых не растут другие почвенные микроорганизмы. Многие виды стрептомицетов образуют пигмент, который не окрашивает или плохо окрашивает колонию и часто выделяется в окружающую среду. В зависимости от вида стрептомицетов, пигменты могут быть разного цвета. Характерной особенностью актиномицетов является способность образовывать антибиотические вещества. Поэтому они являются антагонистами многих микроорганизмов в почве.

Экспериментальная часть

Для изучения антагонизма между стрептомицетами и почвенными бактериями рекомендуется использовать чистые культуры бактерий, выделенные как из почвы, из которой получены чистые культуры стрептомицетов, так и из других почв, в том числе с антропогенными загрязнениями.

Практическая работа состоит из нескольких частей:

1. Выделение из почвы чистых культур стрептомицетов и их идентификация.
2. Выделение чистых культур кокковидных или палочковидных бактерий из почвы, их идентификация и определение физиологических свойств.

3. Эксперимент по выявлению антагонистического влияния стрептомицетов на полученные чистые культуры бактерий.

По итогам проделанной работы студенты делают вывод о зависимости устойчивости бактерий к веществам, выделяемым стрептомицетами, от физиологических и кинетических особенностей, а также от вида почвы, из которой были выделены чистые культуры бактерий.

Студенты выполняют задачу группами по три человека.

Занятие 1

1. Студенты готовятся к эксперименту по выделению стрептомицетов и бактерий из почвы. Для выделения бактерий необходимо сварить питательный агар, залить в пробирки на 2/3 объема (около 15 мл) и закрыть ватно-марлевыми пробками. Количество питательной среды рассчитывается исходя из того, что бактерии высеваются из 2-3 образцов почвы, посев производится из двух пробирок с разведенной суспензией, а также в одну чашку Петри среда заливается из одной пробирки.

Для выделения стрептомицетов студенты готовят среду Ваксмана, имеющую состав (г): глицерин – 3,0; K_2HPO_4 – 1,0; $NaNO_3$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – следы, вода водопроводная – 1000. Питательную среду заливают в пробирки на 2/3 объема (около 15 мл) и закрывают ватно-марлевыми пробками. Количество питательной среды рассчитывается исходя из того, что актиномицеты высеваются из одного образца почвы, посев производится из трех пробирок с разведенной суспензией, а также в одну чашку Петри питательная среда заливается из одной пробирки. К этому количеству необходимо прибавить пробирки, наполовину наполненные питательной средой, для чистых культур стрептомицетов. Планируемое количество выделяемых культур согласовывается с преподавателем. Среда отдает на автоклавирование. После автоклавирования пробирки, наполовину заполненные питательной средой, оставляют застывать в наклонном положении. Полученные скосы в дальнейшем используют для хранения выделенных чистых культур микроорганизмов.

2. Студенты подготавливают пробирки с 9 мл воды, закрытые ватно-марлевыми пробками, для разведения почвы перед посевом микроорганизмов на питательную среду. Количество пробирок рассчитывается исходя из того, что каждый почвенный образец разводится в 10^6 раз, каждая пробирка служит для разведения образца в 10 раз. Пробирки отдают на автоклавирование.

3. Подготавливаются к стерилизации пипетки и чашки Петри. Количество пипеток должно быть равным количеству пробирок с водой с прибавлением пипеток, необходимых для посева бактерий в чашки Петри. Количество чашек Петри рассчитывается по количеству пробирок с питательной средой. Посуду отдают на автоклавирование.

Занятие 2

1. Студенты осуществляют посев бактерий из почвы. Для этого взвешивается по 1 г. образцов почвы. Образцы помещают в пробирки со стерильной водой и взбалтывают в течение 5 минут для экстракции микроорганизмов в воду. Затем пробирки с образцами ставят в штатив для частичного оседания почвенных частиц. Кратность разведения образцов почвы – 10. Почвенный образец необходимо развести в 10^6 раз. Посев бактерий производят из пробирок с разведением в 10^5 , 10^6 раз. Не рекомендуется осуществлять посев бактерий из пробирок с меньшими разведениями, так как на агаре они будут расти сплошным газоном. Посев суспензии объемом 1 мл производится в стерильные чашки Петри, затем в чашку Петри необходимо залить соответствующую расплавленную и охлажденную до 50°C питательную среду. Чашки отдают на инкубирование при 30°C .

2. Студенты выделяют стрептомицеты из почвы. Для этого взвешивают по 1г. образцов почвы. Образцы помещают в пробирки со стерильной водой и взбалтывают в течение 5 минут для экстракции микроорганизмов в воду. Затем пробирки с образцами ставят в штатив для частичного оседания почвенных частиц. Готовят последовательные разведения почвы в 10^4 раз, кратность разведения 10. Посев актиномицетов необходимо производить из пробирок с разведением почвы в 10^2 , 10^3 , 10^4 раз. Посев суспензии объе-

мом 1 мл производится в стерильные чашки Петри, затем в чашку Петри необходимо залить соответствующую расплавленную и охлажденную до 50°C питательную среду. Чашки отдают на инкубирование при 30°C.

3. Просмотр чашек Петри с выросшими бактериальными культурами. Студенты выбирают понравившиеся колонии, делают их описание. Делают мазки, микроскопируют, зарисовывают. Пересевают бактерии из колоний на агаровые скосы.

4. Подготовка к эксперименту по определению физиологических особенностей микроорганизмов. Студенты готовят различные питательные среды: молоко объемом 10 мл, питательный бульон с желатином, твердую картофельную среду, питательный бульон объемом 10 мл. Питательный бульон с желатином готовят следующим образом: варят бульон по рецепту, добавляют желатин в концентрации 15-20%, дают набухнуть в течение 30 минут, затем осторожно нагревают на водяной бане до полного растворения желатина, питательную среду стерилизуют в мягких условиях, при 0,5 ати 30 минут. Для приготовления картофельной среды картофель моют, чистят, затем вырезают пробкорезом цилиндр такого диаметра, чтобы картофель поместился в пробирку. Цилиндр разрезают скальпелем таким образом, чтобы картофель получился со скосом. Полученные полцилиндра снабжают небольшой деревянной палочкой и помещают в пробирку с предварительно налитым питательным бульоном объемом 1 мл. Все пробирки с питательными средами необходимо закрыть ватно-марлевыми пробками. Количество полных комплектов питательных сред равно количеству чистых культур, которые выделили студенты.

5. Студенты готовят необходимые питательные среды и материалы для выделения бактерий из загрязненной почвы. Для этого необходимо воспользоваться методическими указаниями, данными к первому занятию.

Занятие 3.

1. Для определения физиологических особенности выделенных чистых культур бактерии сеют на комплект приготовлен-

ных питательных сред и помещают в термостат при температуре 30°C.

2. Проводят посев бактерий из загрязненной почвы по методике, описанной в первом занятии.

3. Готовят питательную среду для стрептомицетов, разливают в пробирки и снабжают ватно-марлевыми пробками. Количество пробирок должно соответствовать количеству чистых культур стрептомицетов, которые планируется использовать в опыте по антагонизму. Питательную среду отдают на автоклавирувание. Готовят к стерилизации чашки Петри в количестве, равном количеству пробирок с питательной средой.

Занятие 4.

1. Студенты определяют характер роста культур на различных питательных средах.

Рост на молоке: при наличии роста бактерий на молоке (свернувшееся молоко) проверяют с помощью лакмусовой бумаги кислотность культуральной жидкости. Рост на молоке свидетельствует о способности бактерий разлагать лактозу, изменение кислотности среды указывает на бродильный тип энергетического метаболизма.

Рост на картофельном скосе: регистрируется только обильность бактериального урожая. Если рост бактерий на картофеле скудный, то, возможно, что микроорганизмы использовали для роста только ту небольшую часть крахмала, которая гидролизвалась во время стерилизации питательной среды. Бактерии, обильно растущие на картофельном скосе, имеют амилазы для расщепления крахмала.

Рост на питательном желатине: регистрируется не только рост бактерий, но и степень разжижения желатина. Если произошло разжижение желатина, то бактерии обладают протеазами и расщепляют белок.

Рост на бульоне: выявляются аэробы, факультативные анаэробы и анаэробы. Регистрируется характер роста бактерий: пленка на поверхности, равномерный рост по всему объему среды, образование осадка у дна пробирки. По полученным результатам студен-

ты делают выводы о физиологических особенностях бактерий и записывают их в тетрадь.

2. Выделение чистых культур актиномицетов аналогично выделению чистых культур бактерий. Студенты выбирают колонии, делают мазки, микроскопируют, записывают результаты в тетрадь. Колонии стрептомицетов пересевают в чашки Петри на питательную среду и помещают в термостат при температуре 30°C. Полученные чистые культуры в дальнейшем используются в опытах по антагонизму.

3. Чистые культуры бактерий, посеянных из загрязненной почвы, выделяют по методике выделения чистых культур бактерий, описанной выше.

Занятие 5.

1. Определяют физиологические особенности бактерий, выделенных из загрязненной почвы, по методике, описанной выше.

2. Готовят питательную среду для стрептомицетов. Питательная среда используется в опыте по антагонизму. Среду разливают в пробирки, закрывают ватно-марлевыми пробками. Количество питательной среды готовят из расчета, что в одной чашке Петри проводится эксперимент по антагонизму одной культуры стрептомицетов и одной культуры почвенных бактерий. Количество пробирок с питательной средой соответствует количеству чашек Петри. Питательную среду отдают на автоклавирование.

3. Подготовка к стерилизации пробирок с 10 мл воды, закрытых ватно-марлевыми пробками. Количество пробирок должно соответствовать количеству чистых культур, с которыми будет проводиться опыт.

4. Студенты готовят к стерилизации необходимое количество чашек Петри и пипеток. Количество пипеток должно соответствовать количеству чистых культур, с которыми будет проводиться эксперимент.

Занятие 6.

1. Студенты обрабатывают полученные результаты по физиологии бактерий, выделенных из загрязненных почв, по методике, описанной в занятии 4.

2. Опыт по антагонизму. В чашки Петри наливают расплавленный питательный агар и остужают. Чистые культуры разводят в пробирках с водой. 1 мл чистой культуры бактерий стерильно сеют на твердую питательную среду в чашке Петри с помощью пипетки и аккуратно размазывают стерильным шпателем по всей площади. Стерильным пробкорезом аккуратно, соблюдая стерильность, вырезают из твердой питательной среды с чистой культурой актиномицетов, находящейся в чашке Петри, небольшую часть твердой питательной среды с газоном актиномицетов. Вырезанный цилиндр помещают в центр посеянной культуры почвенных бактерий и плотно прижимают к агару. Чашку Петри закрывают и обязательно переворачивают вверх дном. Все чашки Петри (по количеству выбранных для опыта чистых культур бактерий) помещают в термостат при температуре 30°C.

Занятие 7.

1. Обработка результатов эксперимента по антагонизму стрептомицетов и почвенных бактерий. Студенты измеряют диаметры зон подавления роста, которые образуются вокруг стрептомицетов. Делают выводы о различном антагонистическом влиянии актиномицетов на разные роды почвенных бактерий, о зависимости антагонистического влияния актиномицетов на бактерии от загрязненности почвы, от физиологических особенностей бактерий. Оформляют работу и сдают преподавателю.

Тема 7. Исследование микрофлоры пищевых продуктов

Цели работы:

1. Освоить методы определения числа бактерий в пищевых продуктах.

Методические указания

Одним из основных показателей качества пищевых продуктов является их безопасность для здоровья человека. В комплексе исследований продуктов питания важное место занимает определение степени бактериальной обсемененности и наличия условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Бактериологические исследования подразумевают определение в продуктах питания следующих микроорганизмов:

1. количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ);
2. бактерии группы кишечной палочки (БГКП);
3. сальмонеллы;
4. золотистые стафилококки (*Staphylococcus aureus*)
5. сульфитредуцирующие клостридии;
6. *Listeria monocitogenes*;
7. протей;
8. энтерококки;
9. дрожжи;
10. плесневые грибы.

К разным пищевым продуктам предъявляют различные требования, которые отражены в СанПиН 2.3.2.1978-01. Лишь небольшая часть продуктов питания представлена для ознакомления в таблице 2.

Методы определения микроорганизмов и питательные среды для их выделения описаны в соответствующих ГОСТах, методических указаниях, санитарных правилах и нормах и других нормативных документах. Методика микробиологических анализов зависит от вида пищевого продукта. Например, пробы мяса отбирают из глубоких слоев, в яйцах исследуют желток. Хлеб исследуют, как правило, только на наличие сульфитоокисляющих клостри-

дий и плесеней, которых в норме не должно быть. Однако, кондитерские изделия, а также хлебобулочные изделия, содержащие какие-либо добавки, имеют нормативы по допустимому количеству не только этих микробов.

Задача данной лабораторной работы – не следовать строгим методикам, а более упрощенными, чем в бактериологических лабораториях, методами определить обсемененность продуктов питания. В качестве объекта можно использовать молоко с истекшим сроком годности, открытую коробку с соком, простоявшую в холодильнике более суток, или при комнатной температуре более 3 часов и т.д.

Экспериментальная часть

Краткое описание задания.

Студенты выполняют задание группами по 2-3 человека. Каждая группа выполняет микробиологическое исследование молока, хлеба и сока.

Занятие 1

В начале занятия студенты обсуждают с преподавателем особенности стерильного отбора проб, количество и кратность их разведений, питательные среды, необходимые для выделения КМАФАнМ, БГКП, дрожжей и плесневых грибов. Каждая группа студентов рассчитывает необходимое для опыта количество чашек Петри, пробирок с водопроводной водой, пипеток, пинцетов, стеклянных бюксов и стаканов, а также объемы питательных сред, необходимых для работы. Прописи питательных сред представлены в приложении.

Студенты готовят питательные среды, подготавливают необходимую посуду и пробирки с водопроводной водой к стерилизации.

Таблица 2

**Допустимое число микроорганизмов в продуктах
питания**

продукты	КМАФАнМ КОЕ/г (см ³)	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются				Пле- сени, КОЕ/ г (см ³)	Дрожж и, КОЕ/г (см ³)
		БГКП	Суль- фитр. кlostp.	Сальмон.	Stap. aureus		
Мясо пар- ное	10	1		25			
Мясо за- морож.	10 ³	0,1		25			
Мясные полуфабр.	10 ⁵ -10 ⁶	0,0001		25			
Колбасы копченые	-	0,1	0,01		25		
Яйца кури- ные	10 ²	0,1		125			
Молоко	10 ⁵	0,01		25			
Кисломол. Продукты (ср.годн. более 72 ч)	10 ⁷	0,1		25	1	25	25
Сгущ. мо- локо	2 · 10 ⁴	1		25			
Мороженое	10 ⁵	0,1		25	1		
Шоколад, конфеты	10 ³ -10 ⁴	0,1-1		25		50- 100	50-100
Соки и фруктово- ягодные напитки	50	1000				1	5
Хлеб							

Занятие 2.

Каждая группа студентов получает стерильные питательные среды, пробирки с водой для разведения и посуду. Студенты стерильно отбирают пробы молока, хлеба и сока, готовят необходимые разведения и осуществляют посев проб в чашки Петри. На среду Эндо наносят 0,1 мл исследуемой пробы и распределяют по поверхности стерильным стеклянным шпателем, простерилизованным в пламени горелки непосредственно перед употреблением.

Другие питательные среды студенты предварительно расплавляют в пробирках. Необходимые пробы в количестве 1 мл вносят в стерильные чашки Петри, затем осторожно остужают расплавленные среды до 50-60°C и стерильно приливают к пробам. Содержимое чашек Петри перемешивают вращательными движениями, остужают, переворачивают верх дном и помещают в термостат. Дрожжи, плесневые грибы культивируют при 28-30°C 5-7 суток. КМАФАнМ культивируют при той же температуре 2 суток. БГКП культивируют 1-2 суток при 37 °C.

Занятие 3.

Студенты просматривают чашки Петри с культурами, считают колонии, усредняют результаты, сравнивают их с таблицей 2, делают выводы о безопасности данного пищевого продукта для здоровья человека.

Домашнее задание: оформить полный протокол исследования с результатами работы и выводами.

Тема 8. Действие моющих средств на микрофлору рук, поверхностей и оборудования

Цели работы:

1. Освоить методику определения количества микроорганизмов на руках методом смыва.
2. Освоить методику определения количества микроорганизмов на поверхностях и оборудовании методом смыва.

Методические указания

Производство продуктов питания, лекарственных средств и электроники требует поддержания высокого уровня микробиологической чистоты. Микробиологический надзор также необходим на объектах общественного питания, торговой сети, пищеблоках детских, дошкольных и подростковых учреждений. С целью контроля эффективности санитарной обработки инвентаря, оборудования, посуды, санитарной одежды и рук персонала широко используется метод смывов, который дает возможность объективно оценить санитарное содержание обследуемых учреждений.

Санитарные нормы микробиологического контроля рук персонала и поверхностей оборудования зависят от вида производства и класса чистоты помещения.

Класс чистоты чистого помещения – это четко регламентированные требования по уровню содержания в воздухе различного рода примесей и частиц. Классы чистоты различаются по количеству бактерий на единицу объема. Этот параметр, один из важнейших в классификации чистых помещений, регламентируется стандартами. Классификации чистых комнат для различных отраслей имеют свои отличительные особенности.

В таблице 3 приведены классы чистоты помещений для приготовления лекарственных средств.

Требования и нормы зависят от вида готового продукта и характера выполняемых операций. Класс А – локальная зона для проведения операций, представляющих высокий риск для качества продукции (зоны наполнения, укупорки). Класс В – зона, непосредственно окружающая зону А. Класс С – зоны, для выполнения

менее ответственных стадий производства продукции (приготовление растворов и т.д.). • Класс D – работа с компонентами и материалами после мойки, подготовка первичной упаковки и т.д. В помещениях класса D и C может также осуществляться приготовление нестерильных лекарственных средств.

Таблица 3

Классификация чистых помещений производства лекарственных средств в соответствии с ОСТ 42-510-98

Класс чистоты помещений или зон	Максимально допустимое количество частиц в 1 м ³ воздуха размером, мкм				Максимально допустимое количество жизнеспособных микроорганизмов на 1 м ³ воздуха
	> 0,5	> 5	> 0,5	> 5	
	Оснащенное состояние		Функционирующее состояние		
A	3500	0	3500	0	< 1
B	3500	0	35000	2000	10
C	350000	20000	350000	20000	100
D	350000	20000	Не определено		200-500

В других областях применения возможна другая классификация чистых помещений, приведенная в таблице 4.

Согласно федеральному стандарту США 209 E, число класса соответствует количеству частиц размером >0 0,5 мкм в одном кубическом футе воздуха. Классы A и B по ОСТ 42-510-98 примерно соответствуют классам 100 и ISO 5, класс C – классам 10000 и ISO 7, класс D – классу 100000 и ISO 8.

В лечебных учреждениях России принята своя классификация помещений. Класс A (операционные) соответствует по микробиологическим нормам классу D при производстве стерильных лекарственных средств. В классах A и B не допускается присутствие микроорганизмов на перчатках персонала, в классе C – допускается не более 2-3 жизнеспособных микроорганизмов.

На пищевых концентратных предприятиях, где нет высоких требований к микробиологической чистоте, количество механических

частиц не регламентируется, а количество микроорганизмов, обнаруженных на руках персонала, не должно превышать 10 000.

Таблица 4

Классификация чистых помещений по Федеральному стандарту США и ISO

Область применения	Класс по Федеральному стандарту США 209 Е	Класс по стандарту ISO (международная организация по стандартизации)
Производство интегральных микросхем	1	ISO 3
Производство интегральных микросхем с расстоянием между проводниками менее 2 мкм	10	ISO 4
Асептическое производство инъекционных препаратов, требующее отсутствия микроорганизмов и частиц. Хирургические операции по имплантации или трансплантации органов. Изоляция пациентов с иммунным дефицитом, в том числе, после пересадки костного мозга	100	ISO 5
Производство оптических элементов высокого класса. Сборка и испытания прецизионных препаратов. Сборка миниатюрных подшипников.	1000	ISO 6
Точное машиностроение, гидравлика и пневматика, сборка прецизионного гидравлического и пневматического оборудования, клапанов с сервоприводами, высокоточных часовых механизмов	10 000	ISO 7
Пластиковое производство, автомобильная промышленность, сборка электронных компонентов, сборка гидравлических и пневматических устройств	100 000	ISO 8

При проведении санитарно-бактериологических исследований смывов на производствах, не требующих высокой микробио-

логической чистоты, в основном ограничиваются выявлением общего числа бактерий и бактерий группы кишечных палочек. Обнаружение последних расценивают как одно из подтверждений нарушения санитарного режима.

При выявлении вторичного массивного обсеменения готового продукта со значительным превышением в нем общего количества микробов, в смывах определяют общую бактериальную обсемененность и наличие бактерий рода *Proteus* и *St. aureus*.

Поверхности и оборудование также регламентированы по бактериальной обсемененности. В помещениях высоких классов чистоты микроорганизмы не допустимы.

На предприятиях пищевого назначения промышленной чистоты по показателям общей обсемененности санитарное состояние поверхности считается отличным, если ОМЧ на 1 см² не превышает 100, хорошим - при микробном числе от 100 до 1000, удовлетворительным - более 1000, плохим - более 10000. Обсемененность оборудования в цехах, производящих продукты детского и диетического питания, должны быть не более 50 микробных клеток на 100 см² поверхности оборудования.

Во всех случаях биологического контроля присутствие патогенных и спорообразующих бактерий, грибов и дрожжей недопустимо. При их выявлении необходимо проведение дополнительных мер по дезинфекции и выявление источников контаминации.

Экспериментальная часть

1. Влияние бактерицидных и моющих средств на микрофлору рук.

Студенты выполняют работу индивидуально. С преподавателем предварительно оговариваются условия работы: моющее или бактерицидное средство, которым студент будет обрабатывать руки в опыте. Можно сравнить микрофлору рук после использования и без использования полотенца для высушивания обработанных поверхностей.

Занятие 1

В зависимости от количества экспериментов каждому студенту понадобятся две либо три чашки Петри с питательным агаром, и столько же ватных тампонов, простерилизованных с водопроводной водой. Также понадобятся: пять пипеток объемом 1 мл, четыре пробирки с 9 мл водопроводной воды.

Для приготовления тампонов вату накручивают на конец проволоки, еще одно небольшое количество ваты накручивают на проволоку таким образом, чтобы он служил пробкой при помещении проволоки с тампоном в пробирку с 5 мл воды. При этом тампон не должен быть погруженным в жидкость.

Чашки Петри заворачивают в бумагу. Пипетки заворачивают в полоску бумаги, предварительно заложив в широкий кончик вату. Питательный агар готовят из расчета 15 мл для одной чашки Петри. Студенты рассчитывают общее количество чашек Петри, рассчитывают навеску питательной среды и готовят питательный агар в общей колбе по рецепту. После приготовления питательную среду слегка остужают и разливают в пробирки. Пробирки снабжают ватно-марлевыми пробками. Отдельно студенты готовят пробирки с 9 мл водопроводной воды и закрывают их ватно-марлевыми пробками. Все приготовленные материалы и посуду стерилизуют при 1,1 атм 25 минут.

Занятие 2

Во время эксперимента студенты отбирают пробы с грязных рук, затем с рук после обработки моющим средством и высушивания полотенцем, или после обработки моющим средством без высушивания.

Перед отбором пробы тампон увлажняют, погружая его в пробирку с 5 мл стерильной водопроводной воды. Тампоном тщательно делают смывы с тыльной поверхности рук, делая медленные движения, тщательно протирая тампоном между пальцев. После взятия пробы тампон помещают в эту же пробирку.

В случае с грязными руками готовят два 10-кратных разведения, из которых по 1 мл высевает в чашки Петри. Посевы зали-

вают расплавленным и охлажденным до 45-50°C стерильным питательным агаром. Посевы помещают в термостат при температуре 30°C. Если исследуют смывы с обработанных рук – можно не делать разведений, или ограничиться одним 10-кратным разведением.

Занятие 3

Обсемененность рук рассчитывают, исходя из количества колоний и с учетом разведений. Выводы студенты делают самостоятельно при контроле со стороны преподавателя.

2. Влияние бактерицидных и моющих средств на микрофлору оборудования.

Студенты выполняют работу индивидуально. Предварительно с преподавателем оговаривается оборудование и бактерицидное средство, с которыми будет работать студент. При бактериологическом анализе смывов с оборудования и инвентаря, в них определяется общая бактериальная обсемененность.

Занятие 1

Для проведения эксперимента студентам необходимы: тампоны с физиологическим раствором, две чашки Петри со стерильным питательным агаром. Тампоны, чашки Петри и питательная среда готовятся и стерилизуются так же, как описано в пункте 1.

Занятие 2

Перед отбором пробы тампон увлажняют, погружая его в пробирку с 5 мл стерильной водопроводной воды. После отбора пробы тампон помещают в эту же пробирку. Пробы отбираются на поверхности площадью 1 м². В случае если поверхность оборудования или инвентаря небольшая – отбирают пробы на площади 25*25 см. Студенты отбирают пробы медленными движениями тампона параллельными близко расположенными линиями, затем перпендикулярными линиями по отношению к первым.

После отбора пробы тампон возвращается обратно в пробирку, содержимое тщательно перемешивается и 0,1 мл суспензии

высеваются в чашку Петри. Посевы заливают расплавленным и охлажденным до 45°C стерильным питательным агаром.

После исследования обсемененности оборудования студенты обрабатывают поверхность бактерицидным средством и снова отбирают высевают пробы вышеописанным способом.

Посевы помещают в термостат при температуре 30°C .

Занятие 3

При подсчете количества микроорганизмов на 1 см^2 площади студенты принимают во внимание площадь, на которой отбирали пробы, количество воды в пробирке, объем высеваемой суспензии.

После санитарной обработки общая обсемененность 1 см^2 поверхности оборудования, изготовленного из металла, стекла, резины, пластмассы, дерева, не должна превышать 300 микробных клеток. Выводы студенты делают самостоятельно при контроле со стороны преподавателя.

Тема 9. Действие почвенных бактерий на рост растений

Цели работы:

1. Научиться выделять из почвы азотфиксирующие бактерии и актиномицеты.
2. Исследовать влияние выделенных культур на рост растений.

Методические указания

Почвенные бактерии играют важную роль: участвуют в биогеохимических циклах основных химических элементов, поддерживают плодородие почвы, оказывают большое влияние на рост растений.

Растения получают от бактерий различные стимулирующие рост вещества. Клубеньковые бактерии *Rhizobium*, свободноживущие *Azotobacter*, *Azospirillum* фиксируют азот воздуха, переводя его в ионы аммония, источник азота для растений. Некоторые бактерии выделяют индолилуксусную кислоту, стимулирующую рост растений. Псевдомонады синтезируют салициловую кислоту, относящуюся к гормонам растений. Бактерии-антагонисты подавляют патогенные для растений организмы. *Streptomyces*, *Agrobacter*, *Enterobacter* и другие подавляют рост патогенных бактерий, выделяя антибиотические вещества, конкурируя за субстрат, имея более высокую скорость роста. Почвенные бактерии образуют различные низкомолекулярные соединения, в том числе, биопестициды, фунгициды. Бактерии *Bacillus thuringiensis* образуют несколько токсичных для насекомых соединений, в том числе экзотоксины и эндотоксины. Азотобактер, помимо фиксации азота, способен синтезировать биологически активные вещества: никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин, фунгицидные вещества и др.

Использование чистых культур почвенных микроорганизмов в качестве удобрений началось с 20-х годов прошлого столетия. В настоящее время известны удобрения, состоящие из монокультур (*Azotobacter*, *Bacillus megaterium*, *Rhizobium*) и комбинированные, в состав которых могут входить бактерии разных родов, например, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Lactobacillus*. Считается, что

комбинированные бактериальные удобрения более эффективны, чем удобрения, состоящие из монокультур.

Наиболее распространенными бактериями в современных бактериальных удобрениях являются азотобактеры и актиномицеты.

Azotobacter – свободноживущие почвенные азотфиксирующие бактерии. Это крупные клетки овальной формы. Азотобактер отрицательно окрашиваются по методу Грама, не образуют спор в неблагоприятных условиях, но образуют цисты. На питательной среде Эшби колонии слизистые. Источниками углерода могут быть углеводы, спирты, соли органических кислот. Оптимальный pH роста 7,0-7,5. Если бактерии растут в присутствии источников связанного азота (нитрат, соли аммония, некоторые аминокислоты), то могут расти в широком диапазоне pH (4,8-8,5).

Процесс азотфиксации зависит от энергии АТФ, ингибируется наличием в питательной среде источников связанного азота. Нитрогеназная система, катализирующая превращение азота в ионы аммония, является мультиферментным комплексом, содержащим железосерные белки, ионы молибдена, и чувствительна к кислороду. Однако *Azotobacter* являются облигатными аэробами. Вероятно, нитрогеназа работает в аэробных условиях потому, что клетки осуществляют интенсивное дыхание. Скорость энергетического метаболизма настолько высока, что в клетках постоянно поддерживается очень низкая концентрация кислорода. Азотобактеры также выделяют слизь, которая препятствует активному проникновению кислорода к клеткам, уменьшая скорость его диффузии.

Благодаря способности связывать азот воздуха, азотобактер стали одними из первых бактерий, на основе которых было получено бактериальное удобрение.

Актиномицеты являются важной составляющей микробиоты почвы. Основная характеристика этих микроорганизмов дана в лабораторной работе 6 второй части практикума.

Экспериментальная часть

Студенты выполняют работу по два-три человека.

Занятие 1.

Студенты готовят питательные среды для выделения из почвы бактерий рода *Azotobacter* и *Streptomyces*. Для азотобактеров используют питательную среду Эшби, для стрептомицетов – питательную среду Ваксмана. Питательные среды готовят по прописи в приложении. Для этого студентам необходимо рассчитать объем питательной среды, исходя из того, что азотобактерии выделяют из комочка почвы, приложенного к питательной среде, а стрептомицеты – путем десятикратных разведений. Целесообразно высевать актиномицеты не из одного, а из нескольких разведений (чаще всего, из второго, третьего и четвертого). Это необходимо учитывать при расчете количества питательной среды, чашек Петри, пробирок с 9 мл воды для десятикратных разведений, а также пипеток объемом 1 мл. Студенты предварительно обсуждают это с преподавателем.

Питательную среду готовят из расчета, что 100 мл среды необходимо разлить в 6 пробирок примерно на 2/3 объема, и после стерилизации питательная среда из одной пробирки выливается в одну чашку Петри.

Компоненты питательных сред взвешивают, разводят необходимым количеством воды в колбе, нагревают на плитке до расплавления агара. Питательные среды разливают по пробиркам, закрывают пробирки ватно-марлевыми пробками и отдают на стерилизацию в автоклаве (1,1 ати, 22 минуты).

Чашки Петри, пипетки заворачивают и отдают на стерилизацию в сушильном шкафу (180°C в течение 1 часа), либо в автоклаве (1,1 ати, 22 минуты).

Для стерилизации в автоклаве также готовят водопроводную воду, наливая по 9 мл в пробирки и закрывая ватно-марлевыми пробками.

Занятие 2

Студенты получают простерилизованную посуду и питательные среды. Агаризованные питательные среды нагревают на водяной бане до расплавления.

Расплавленную среду Эшби выливают в чашки Петри (одна пробирка – одна чашка). После застывания агара на поверхность стерильно помещают 2-3 нестерильных комочка почвы. Через несколько минут чашки Петри переворачивают верх дном и помещают в термостат при температуре 28-30°C.

Для выделения актиномицетов взвешивают 1 г. почвы и стерильно помещают в пробирку с водой. Пробирку встряхивают в течение 5 минут, а затем на несколько минут оставляют в штативе, для того чтобы осела основная часть почвы. После этого готовят четыре последовательных десятикратных разведения. В стерильные чашки Петри стерильно помещают по 1 мл из второго, третьего и четвертого разведений. Затем расплавленную агаризованную среду Ваксмана остужают до 50°C, выливают в чашку Петри, перемешивают несколькими круговыми движениями питательную среду с разведенной суспензией и оставляют застывать. После застывания агара чашки Петри переворачивают и помещают в термостат при 28-30°C.

Занятие 3

Студенты просматривают выросшие культуры. Колонии азотобактеров и актиномицетов определяют визуально. Из определяемых колоний часть отбирают для приготовления мазков. Стрептомицеты окрашивают фуксином или метиленовой синью, при микроскопии определяют как микроорганизмы с тонкими нитями. Так как азотобактеры выделяют слизь, то студенты окрашивают мазок по методу Гинса (выявление капсул и слизи). Для этого на конец предметного стекла наносят каплю жидкой черной туши, вносят в нее культуру клеток, хорошо перемешивают, ребром покровного стекла размазывают по всей поверхности предметного стекла. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют в смеси Никифорова 5-10 минут и окрашивают Фуксином по Цилю, разбавленным в четыре раза, в течение 2-3 минут. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют с иммерсионной системой. Азотобактер в микроскоп видны как красные кокки, расположенные одиночно или парами, окруженные бесцветными капсулами на темном фоне туши.

Для выделения чистой культуры студенты готовят питательные среды для азотобактер и актиномицетов, чашки Петри (из расчета, что отдельный вид будет перенесен на две чашки Петри), отдают на стерилизацию в автоклаве при 1,1 ати.

После стерилизации студенты разливают стерильную питательную среду в чашки Петри. На поверхность соответствующей застывшей питательной среды с помощью петли штрихом пересевают азотобактер и актиномицеты. Чашки Петри помещают для культивирования в термостат (28-30°C).

Для работы на следующем занятии студенты готовят воду (по 10 мл) в пробирках с ватно-марлевыми пробками и отдают на стерилизацию в автоклаве при 1,1 ати.

Занятие 4

Студенты получают чашки Петри с культурами. Для получения суспензий микроорганизмов их стерильно переносят с помощью микробиологической петли в пробирки со стерильной водой. В половинки чашек Петри закладывают почву, помещают по 5-7 семян ячменя или пшеницы. Ставят следующие опыты:

1. Полив суспензией, содержащей бактерии *Azotobacter*,
2. Полив суспензией содержащей стрептомицеты,
3. Полив суспензией, содержащей *Azotobacter* и стрептомицеты одновременно. Контролем служат чашки Петри с семенами, которые поливают водой. Желательно провести по три эксперимента в каждом опыте

Занятие 5

Студенты отмечают количество проросших семян в чашках Петри, корнеобразование, измеряют длину проростков, делают выводы о влиянии бактерий на рост растений и сдают преподавателю оформленный протокол опыта.

Тема 10. Подготовка семян к выращиванию в искусственных условиях

Цель работы:

1. Научиться подбирать условия для стерилизации семян

Методические указания

Стерильные семена нужны для выращивания растений в лабораторных условиях, для изучения влияния бактерий на рост растений.

Для стерилизации семян можно использовать различные химические агенты. К ним относятся: 96%-й этиловый спирт, 1%-й раствор формалина, 6%-й раствор хлорамина, 2-5%-й раствор гипохлорита кальция, 3%-й раствор перекиси водорода и т.д. Растворы, содержащие активный хлор, используются один раз, и готовят их непосредственно перед работой, остальные растворы можно применять многократно.

Стерилизовать семена можно одним каким-либо раствором. Но не все растворы эффективны. Например, этиловый спирт оказывает бактерицидное действие на вегетативные клетки и не действует на споры. Поэтому более эффективной считается последовательная стерилизация несколькими растворами.

Важно не только полностью избавить семена от микробов, но и сохранить их всхожесть. Например, этиловый спирт губит зародыши семян за несколько минут. Поэтому время экспозиции определяется обычно экспериментально. Для 96%-ного этилового спирта – несколько секунд, для гипохлорита кальция – не более 8 минут. Для перекиси водорода и хлорамина это время может составлять 30-60 минут. Время стерилизации зависит не только от стерилизующего агента, но и от поверхности семян. Гладкие семена таких растений, как горюцвет, песчанка, фасоль, можно стерилизовать при минимальном времени экспозиции. Дольше нужно выдерживать семена с шероховатыми поверхностями. Если семена покрыты ворсинками, то, как правило, они плохо смачиваются водой. Поэтому, наряду с увеличением времени экспозиции, необхо-

димо к стерилизующим агентам добавлять поверхностно-активные вещества, детергенты, такие как твин-80.

После стерилизации семена необходимо стерильно промыть несколько раз стерильной дистиллированной водой.

Стерильность семян можно проверить, помещая их на поверхность питательного агара. Для того чтобы проверить всхожесть семян после действия стерилизующих агентов, их помещают на поверхность водного агара.

Экспериментальная часть

Занятие 1

Студенты выполняют работу по два человека. Каждая пара студентов выбирает два способа стерилизации: одним и несколькими веществами.

Стерилизацию семян осуществляют в чашках Петри. Перед предварительной подготовкой к стерилизации семян студенты обсуждают с преподавателем выбор стерилизующего агента, концентрацию, приготовление растворов и время стерилизации. Студентам предлагается перекись водорода, насыщенный раствор соды, этиловый спирт, хлорамин.

Студенты готовят к стерилизации дистиллированную воду в колбах и чашки Петри в количестве, обговоренном с преподавателем. Чашки Петри необходимы для стерилизации семян, а также для их проверки на стерильность и всхожесть на водном и питательном агаре.

Студенты готовят водный агар. К водопроводной воде добавляют 2% агар-агара, расплавляют и разливают высоким столбиком по пробиркам. Пробирки снабжают ватно-марлевыми пробками. Питательный агар готовят по рецепту, разливают по пробиркам высоким столбиком и закрывают ватно-марлевыми пробками. Все среды отдают на стерилизацию в автоклаве при 1,1 ати в течение 20-25 минут.

Занятие 2

Студенты получают семена и замачивают их в мыльной воде на 0,5 часа. Затем промывают несколько раз водопро-

вакбесодной водой, замачивают на 10 минут в дистиллированной воде, затем воду сливают.

Растворы хлорамина, перекиси водорода, соды готовят на дистиллированной воде.

Стерильный водный и питательный агар расплавляют на плитке, выливают в стерильные чашки Петри (одна пробирка – одна чашка Петри) и оставляют застывать.

Для стерилизации семена помещают в стерильную чашку Петри в количестве не более 25-30 штук. Стерилизуют семена по плану, обсужденному с преподавателем. Растворы из чашек Петри сливают, соблюдая правила стерильности. При ступенчатой стерилизации после каждого стерилизующего раствора семена выдерживают 10 минут в стерильной воде.

После стерилизации в чашки Петри заливают стерильную воду. Время выдержки 10 минут. Процедуру проводят троекратно. Каждый раз воду сливают, соблюдая правила стерильности.

Отмытые семена стерильно сеют на поверхность водного агара для контроля прорастания после действия стерилизующих растворов, и на питательный агар для микробиологического контроля. Чашки культивируют в термостате при температуре 28-30°C

Для посева семян используются пинцеты, которые перед каждой манипуляцией необходимо фламбировать в пламени горелки и остужать о внутреннюю поверхность приоткрытой крышки чашки Петри.

Занятие 3

Студенты получают чашки Петри с семенами, определяют процент всхожести семян на водном агаре и делают выводы о повреждающем действии стерилизующего агента (агентов). По отсутствию роста или по росту бактерий на питательном агаре с семенами, по количеству колоний судят о стерилизующих способностях растворов. Обсуждая результаты, выбирают оптимальный режим стерилизации данного вида семян.

Преподавателю сдают оформленный протокол опыта.

Тема 11. Влияние различных концентраций нефти на антагонизм родококков и почвенных бактерий

Цели работы:

1. Научиться выделять родококки из почвы.
2. Закрепить навыки проведения экспериментов по антагонизму.

Методические указания

Родококки – бактерии, относящиеся к актиномицетам. Это полиморфные микроорганизмы. Они могут образовывать различные формы от кокков и палочек до нитей с боковыми выростами либо элементарным ветвлением, которые могут вновь распадаться до коротких палочек и кокков. Колонии родококков могут быть окрашены в желтый, желто-коричневый, кремовый, оранжевый или красный цвет. Это грамположительные, как правило, частично кислотоустойчивые, анаэробные бактерии. При обработке кислотой они не теряют своей окраски. Это свойство обусловлено наличием в клеточной стенке бактерий сложных липидов, в частности миколовых кислот.

Родококки хорошо растут на питательном агаре, однако из почвы их выделяют на специальные среды для родококков. Обычно, родококки выделяют из почвенной суспензии, разведенной в 100-10 000 раз. Некоторые виды патогенны для человека и животных.

С конца XX века родококки, благодаря своей способности хорошо расти на компонентах нефти, стали широко использоваться в биологической очистке почв от нефтяных загрязнений.

Родококки уменьшают концентрацию нефти в почве, однако и нефть оказывает влияние на жизнедеятельность этих микроорганизмов. Например, концентрация нефти влияет на антагонистические отношения родококков с другими почвенными микроорганизмами.

Экспериментальная часть

Эксперименты выполняют по два студента.

Занятие 1.

Студенты получают задание: выделить из почвы родококки и бактерии рода *Bacterium*. Студенты обсуждают с преподавателем кратность опытов, разведение почвы, из которого будет производиться посев микроорганизмов на питательные среды. Считают количество питательной среды, количество пипеток, чашек Петри, пробирок с водой для разведения. У студентов должны быть: пробирки с 9 мл воды, снабженные ватно-марлевыми пробками, пробирки с питательными средами, заполненные на 2/3 объема, также снабженные ватно-марлевыми пробками, количество которых должно быть равным количеству чашек Петри. Количество чашек Петри, которые студенты готовят к стерилизации, должно быть равно количеству кратности опытов. Пипетки объемом 1 мл считают следующим образом: для приготовления каждого десятикратного разведения требуется одна стерильная пипетка, по одной стерильной пипетке также потребуется для посева по 1 мл из соответствующего разведения в чашки Петри.

Для выделения *Bacterium* готовят питательный агар. Для выделения из почвы родококков студенты готовят специальную питательную среду для родококков, пропись в которой есть в приложении. Затем питательные среды разливают по пробиркам, готовят посуду к стерилизации и отдают на автоклавирование при 1,1 атм в течение 20-25 минут.

Занятие 2.

Студенты получают стерильные посуду и питательные среды и почву для выделения родококков и *Bacterium*. Родококки и бактерии выделяют из почвы методом Коха, описанном в лабораторной работе 7 первой части практикума.

Питательную среду в пробирках расплавляют в водяной бане. Студенты с преподавателем обсуждают количество почвенных разведений, из которых будет производиться посев родококков и *Bacterium* на соответствующие питательные среды, вспоминают

порядок действий при посеве методом Коха. Микроорганизмы выделяют из 1 г. почвы

Чашки Петри после застывания питательной среды обязательно проверяют. Если среда застыла – их переворачивают верх дном, для того, чтобы конденсат, образующийся в процессе культивирования, не размывал колонии, а скапливался на крышке чашки Петри. Чашки отдают на инкубирование в термостате при температуре 25-28°C.

Студенты на этом занятии также готовят питательную среду для родококков и питательный агар для выделения чистых культур, которое будут проводить на следующем занятии. Студенты могут сообща готовить питательные среды с таким расчетом, чтобы каждая пара студентов имела по две пробирки с необходимыми питательными средами. Каждая пара студентов также готовит к стерилизации по 4 чашки Петри. Питательные среды и чашки Петри отдают на автоклавирование.

Занятие 3.

На занятии студенты получают чашки Петри с культурами. Студенты рассматривают и описывают отдельные колонии.

В чашках с питательной средой для родококков студенты выбирают цветные колонии, готовят препараты-мазки, проверяют бактерии на кислотоустойчивость. По результатам микроскопирования (культура должна быть полиморфной) и теста на кислотоустойчивость (родококки частично кислотоустойчивы) студенты делают выводы о принадлежности бактерий выбранной колонии к родококкам.

Тест на кислотоустойчивость студенты проводят по способу Циль-Нильсена:

На обезжиренном стекле готовят мазок, высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На стекло накладывают фильтровальную бумагу и препарат заливают карболовым фуксин-ом Циля. Препарат прогревают 2-3 раза до появления паров, держа его высоко над пламенем горелки. Затем препаратау дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, препарат промывают водой и обесцвечивают 5%-ным раствором H_2SO_4 , 2-3 раза погру-

жая в стаканчик с серной кислотой. Затем препарат тщательно промывают под струей воды и докрашивают метиленовым синим в течение 3 минут. Краску смывают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют. Кислотоустойчивые клетки сохраняют красный цвет. Клетки, не устойчивые к кислоте, окрашиваются в синий цвет.

В чашках с питательным агаром студенты выбирают колонии, готовят препараты-мазки. Если по результатам микроскопирования студенты определяют *Bacterium* – колонию, из которой была отобрана культура для мазка, используют для получения чистой культуры

Для получения чистой культуры студенты расплавляют в пробирках на водяной бане питательный агар и агаризованную среду для родококков. Расплавленные среды стерильно заливают в стерильные чашки Петри из расчета одна пробирка – одна чашка Петри. Когда питательная среда застынет – стерильной петлей стерильно пересевают бактерии из выбранных колоний. Из одной колонии пересевают бактерии в одну чашку Петри. Каждая пара студентов должна иметь две чашки Петри с чистыми культурами родококков и две чашки Петри с чистыми культурами бактерий. Подписанные чашки Петри с посеянными культурами ставят в термостат и инкубируют при температуре 25-28°C.

Занятие 4.

Студенты получают чашки Петри с культурами. Убедившись в чистоте культур, оставляют чашки Петри с *Bacterium* в холодильнике до следующего занятия.

Подготовка к эксперименту по антагонизму. Студенты готовят питательную среду для родококков и разливают по пробиркам ровно по 10 мл. Каждая пара студентов под договоренности с преподавателем добавляет разный объем нефти от 0,1 до 0,5 мл. Питательную среду варят из расчета, что каждая группа студентов выполняет эксперимент с одной концентрацией нефти и в трехкратной повторности. Студенты заворачивают необходимое количество чашек Петри из расчета количества опытов и отдают на стерилизацию. После автоклавирования студенты дают чашкам Петри

и питательным средам слегка остыть, заливают в чашки еще не застывшую питательную среду и оставляют застывать. Затем в чашки Петри штрихом засевают родококки из чашек Петри с чистыми культурами. Чашки переворачивают крышками вниз, ставят в термостат и инкубируют при температуре 25-28°C.

Для следующего занятия готовят по 5 мл воды в пробирках, питательный агар из расчета по три пробирки высокого столбика каждой паре студентов, заворачивают по три чашки Петри, по одной пипетке на 1 мл для каждой пары и отдают на стерилизацию.

Занятие 5

Опыт по антагонизму родококков и почвенных бактерий проводят методом агаровых блоков в трехкратной повторности, .

Питательный агар расплавляют и разливают в чашки Петри (агар из 1 пробирки заливают в одну чашку Петри) и дают застыть. Студенты стерильно переносят микробиологической петлей культуру бактерий из чашки Петри в пробирку с водой. На поверхность питательного агара из пробирки с бактериями стерильно с помощью пипетки переносят по 0,1 мл суспензии. Стеклянным шпателем, простерилизованным в пламени горелки, распределяют бактерии по поверхности питательной среды.

Пробкорезом, простерилизованным в пламени горелки, аккуратно вырезают агаровый блок из чашки Петри с родококками, растущими на нефти, и ставят посередине чашки Петри с почвенными бактериями, слегка придавливая к поверхности питательной среды. Чашку Петри переворачивают вверх дном и отдают на инкубацию при 28-30°C в течение суток.

Занятие 6

Студенты получают чашки Петри, измеряют зону стерильности вокруг агарового блока и делают выводы о влиянии нефти на антагонистические отношения родококков и микроорганизмов рода *Bacterium*.

Преподавателю сдают оформленный протокол эксперимента с выводами.

Список литературы

1. ГОСТ ИСО 14644 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды». ГОСТ ИСО 14644-1-2002 Часть 1: «Классификация чистоты воздуха». – М.: ИПК Издательство стандартов, 2003. – 20 с.
2. ГОСТ Р ИСО 14644 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды». ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007 Часть 3: «Методы испытаний». – М., 2008. – 54 с.
3. ГОСТ Р ИСО 14644 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды». ГОСТ Р ИСО 14644-5-2005 Часть 5: «Эксплуатация». – М., 2005. – 35 с.
4. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств». – М.: Стандартинформ, 2009. – 65 с.
5. ГОСТ Р 52550-2006 «Производство лекарственных средств. Организационно-технологическая документация». ГОСТ Р 52550-2006 «Производство лекарственных средств. Организационно-технологическая документация». – М.: Стандартинформ, 2006. – 26 с.
6. ГОСТ Р 52537-2006 «Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества». – М.: Стандартинформ, 2006. – 35 с.
7. ГОСТ Р 52239-2006 «Чистота воздуха в лечебных учреждениях. Общие требования». – М., Стандартинформ, 2006. – 48 с.
8. Нетрусов, А. И. Микробиология : учеб. для вузов по напр. подгот. бакалавра "Биология" и биол. спец. рек. МО РФ / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - М. : Академия, 2006. – 349 с
9. Нетрусов, А. И. Микробиология : учеб. для вузов по направлению "Педагогическое образование" профиль "Биология" / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. - М. : Академия, 2012. – 375 с.
10. Об утверждении инструкции о правилах и методах обезвреживания отходов лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники. Постановле-

ние министерства здравоохранения Республики Беларусь № 81 от 22 ноября 2002 г.

http://minzdrav.gov.by/ru/static/acts/normativnye/postanovlenia_ministerstva/ob-utverzhenii-instruktsii-o-pravilax-i-metodax-obezvrezhivaniya-otxodov-lekarstvennyx-sredstv-izdelij-medsinskogo-naznachenija-i-medsinskoj-texniki_i_1043.html

11. ОСТ 42-510-98. Стандарт отрасли. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Введен в действие совместным приказом Минздрава РФ и Минэкономики РФ 3 декабря 1999г. N 432/512
12. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. Высш. Учеб. Заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
13. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х томах: Т.2. Пер. с англ./ Под ред. Й. Ленгелера, Г.Древса, Г.Шлегеля. – М.:Мир,2005. – 496с.
14. Янчилин, В. Санитары почвы – / В. Янчилин // В мире науки. – 2009. – №9. – С.34-39
15. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 [PDF - 948 KB]
http://ic.ucsc.edu/~saltikov/bio119/lecture/23_lecture_Antibiotics.pdf

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Список питательных сред

1. Питательная среда для азотобактер (среда Эшби). Состав, г: сахара – 20; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $NaCl$ – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; вода водопроводная – 1000. В среду можно внести 1 мл смеси микроэлементов, состав которой (по Федорову), г: H_3BO_3 – 5,0; $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 5,0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; KI – 0,5; $NaBr$ – 0,5; $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ – 0,3; вода дистиллированная – 1000. Компоненты взвесить, растворить в воде, автоклавируют при 1,1 ати 25 минут.

2. Питательная среда для актиномицетов (среда Ваксмана). Состав: г: глицерин (плотность $1,261 \text{ г/см}^3$) – 3,0; K_2HPO_4 – 1,0; $NaNO_3$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; вода водопроводная – 1000. Компоненты взвесить, растворить в воде, автоклавируют при 1,1 ати 25 минут.

3. Глюкозо-аммонийная среда для дрожжей. Состав, г: глюкоза – 20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; K_2HPO_4 – 0,15; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $NaCl$ – 0,1; $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,1; вода дистиллированная – 1000 мл. Компоненты взвесить, растворить в воде, автоклавируют при 0,5 ати 30 минут.

4. Питательная среда для дрожжей и мицелиальных грибов (среда Сабуро). Состав, г: глюкоза – 40,0; пептон – 10,0; вода водопроводная – 1000 мл. Компоненты взвесить, растворить в воде. Стерилизация при 0,5 ати 30 минут.

5. Питательная среда для уробактерий. К 100 мл готового питательного бульона добавить 10 г мочевины. Стерилизации не требуется.

6. Питательная среда для родококков. Состав, г: сахара – 1; $NaNO_3$ – 0,5; $MgCl_2$ – 0,1; $CaCO_3$ – 1; K_2HPO_4 – 7; KH_2PO_4 – 3; вода водопроводная – 1000 мл. Стерилизация при 1,1 ати 25 минут.

Примечание: для уплотнения в питательные среды 1-6 добавляют 20 г. агара. В этом случае для того, чтобы агар растворился, среды необходимо довести до кипения. Затем разливать по пробиркам и стерилизовать.

7. Питательный бульон с желатином. К 1 литру готового питательного бульона добавить 150 г желатина и оставить на полчаса. Через полчаса поставить на водяную баню и нагревать до растворения желатина. Стерилизовать при 0,5 ати 30 минут

8. Водный агар. К 1000 мл водопроводной воды добавить 20 г агара, довести до кипения, чтобы растворить агар. Стерилизовать при 1,1 ати 25 минут.

9. Картофельная среда. Пробкорезом диаметром 0,5 см вырезать цилиндрики из картофеля, разрезать пополам, чтобы получилась скошенная поверхность. У спички отрезать головку, спичку вставить в основание цилиндра. В пробирку налить 1 миллилитр воды и поместить туда готовый цилиндр таким образом, чтобы картофель не касался воды. Пробирку снабдить ватно-марлевой пробкой. Стерилизовать при 1,1 ати 25 минут.

Готовые питательные среды

1. Питательный агар. Готовить согласно инструкции. Автоклавировать при 1,1 ати 25 минут.

2. Питательный бульон. Готовить согласно инструкции. Автоклавировать при 1,1 ати 25 минут.

3. Среда Эндо для бактерий группы кишечной палочки (БГКП). Готовить согласно инструкции. Автоклавировать при 0,5 ати 30 минут.

4. Бифидум-среда. Готовить согласно инструкции. Автоклавировать при 0,5 ати 30 минут.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Рецепты некоторых красителей

1. Генциановый фиолетовый карболовый

Раствор первый: генциановый фиолетовый – 1 г., этанол 96%-ный – 10 мл.

Раствор второй: 5%-ный водный раствор фенола – 100 мл.

Растворы смешивают после полного растворения генцианового фиолетового в спирте

2. Метиленовый синий по Леффлеру

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего – 30 мл, вода дистиллированная – 100мл, КОН, 1%-ный водный раствор – 1 мл.

Насыщенный раствор метиленового синего готовят, взвешивая 3г порошка метиленового синего, и растворяя его в 100 мл этанола. Через 2-3 дня раствор фильтруют. Краситель устойчив.

3. Раствор Люголя в модификации Грама

Йод кристаллический – 1г., калий йодистый – 2 г., вода дистиллированная – 300мл.

В ступку помешают навеску йода и йодистого калия, растирают пестиком. Продолжая растирать, добавляют 1 мл воды. Не прекращая растирать, добавляют еще 5 мл воды. Йод растворяется в йодистом калии. Раствор переносят в склянку из темного стекла и добавляют оставшиеся 294 мл воды. Срок годности: 30 дней.

4. Раствор Люголя для выявления гликогена

Йод кристаллический – 1г, калий йодистый – 3 г, вода дистиллированная 300 мл. Методика приготовления раствора аналогична приготовлению раствора Люголя в модификации Грама.

5. Сафранин, водный раствор

2,5%-ный раствор сафранина в 96%-ном этаноле – 10 мл, вода дистиллированная – 100 мл.

6. Судан III

0,1 г судана III растворяют в смеси из 50 мл 96%-ного этиового спирта и 50 мл глицерина. Через 48 часов раствор фильтруют. Реактив устойчив.

7. Фуксин основной, водный раствор

Карболовый фуксин Циля – 1мл, вода дистиллированная – 9 мл. Готовят перед употреблением: раствор нестойкий.

Карболовый фуксин Циля готовят из насыщенного спиртового раствора фуксина, которого требуется 10 мл. К нему добавляют 100 мл 5%-ного раствора фенола. Краситель устойчив.

Насыщенный спиртовой раствор фуксина готовят, взвешивая 10 г. порошка фуксина основного и растворяя в 100 мл 96%-го этанола. Через 48 часов раствор фильтруют. Краситель устойчив.

Учебное издание

Маградзе Елена Ильинична

Лабораторный практикум по микробиологии

Учебно-методическое пособие

Авторская редакция

Подписано в печать Формат

Усл.печ л. Уч-изд. Л.3,3.

Тираж 60 экз. Заказ №

Издательский центр «Удмуртский университет»
426034, Ижевск, Университетская, д. 1, корп. 4, каб. 207