



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО ПО
ОБРАЗОВАНИЮ**

**ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЛЁГКОЙ
И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

**Кафедра: «Технология хлебопекарного, кондитерского и макаронного
производств»**

Е.А.Кузнецова

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Дисциплина– «Микробиология»

**Специальности – 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных
изделий», 270800 «Технология консервов и пищевых концентратов», 271200
«Технология общественного питания».**

**Рекомендовано редакционно –
издательским советом ОрелГТУ**

Орел 2005

Автор: к.б.н., доцент кафедры «Технология хлебопекарного, кондитерского и макаронного производств» Е.А. Кузнецова

Рецензенты:

Д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Технология продуктов питания» Орловского института экономики и торговли Е.В.Литвинова

к.т.н., доцент кафедры «Технология хлебопекарного, кондитерского и макаронного производств» Орловского государственного технического университета В.В. Румянцева

Учебно-методическое пособие предназначено для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Микробиология» студентами специальностей 270300 «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий», 270800 «Технология консервов и пищевых концентратов», 271200 «Технология общественного питания», а также может быть рекомендовано студентам специальностей 351100 «Товароведение и экспертиза продовольственных товаров» и 271100 «Технология молока и молочных продуктов» при изучении дисциплин «Основы микробиологии» и «Биология и микробиология».

Редактор С.Ч. Алиева

Технический редактор

Орловский государственный технический университет

Лицензия № 00670 от 05.01.2000 г.

Подписано к печати 25.01.2003. Формат 60х84 1/16

Печать офсетная. Уч.- изд. л. 2,7. Усл. печ. л. Тираж 150 экз.

Заказ № _____

Отпечатано с готового оригинал-макета

На полиграфической базе ОрелГТУ,

302020, г.Орёл, ул. Наугорское шоссе, 29

© ОрелГТУ, 2004

© Кузнецова Е.А., 2004

СОДЕРЖАНИЕ

	стр
Введение.....	4
Часть 1. Краткая характеристика микроорганизмов и основные методы микробиологических исследований	21
Глава 1. Морфология микроорганизмов. Характеристика отдельных групп.....	21
Глава 2. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.....	51
Глава 3. Стерилизация.....	59
Глава 4. Культивирование микроорганизмов.....	81
Глава 5. Выделение чистых культур.....	113
Часть 2. Лабораторный практикум.....	124
Лабораторная работа 1. Устройство микроскопа и правила работы с ним. Приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов.....	124
Лабораторная работа 2. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов.....	129
Лабораторная работа 3. Дифференциальные и негативные способы окраски бактерий.....	133
Лабораторная работа 4. Выявление некоторых структур и включений в клетках микроорганизмов.....	137
Лабораторная работа 5. Приготовление питательных сред для микроорганизмов.....	142
Лабораторная работа 6. Приготовление дифференциально-диагностических сред для культивирования микроорганизмов..	144
Лабораторная работа 7. Получение накопительных культур микроорганизмов.....	147
Лабораторная работа 8. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов.....	149

Лабораторная работа 9. Выделение чистой культуры микроорганизмов.....	151
Лабораторная работа 10. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов.....	153
Лабораторная работа 11. Определение чистоты выделенной культуры. Изучение культуральных особенностей микроорганизмов...	156
Лабораторная работа 12. Определение количества клеток микроорганизмов.....	160
Лабораторная работа 13. Исследование пищевых продуктов..	162
Лабораторная работа 14. Микробиологическое исследование молока – проба на редуктазу.....	164
Лабораторная работа 15. Эпифитные микроорганизмы зерна..	166
Лабораторная работа 16. Определение количества дрожжей и молочнокислых бактерий в полуфабрикатах.....	170
Рекомендуемая литература.....	173
Приложение.....	174

ВВЕДЕНИЕ

Слово «микробиология» происходит от трех греческих слов: *micro* – малый, *bios* – жизнь и *logos* – учение. Микробиология – это раздел биологии, изучающий морфологию, систематику, генетику, физиологию и распространение в природе микроорганизмов. Живые существа, составляющие мир микроорганизмов, весьма разнообразны и не объединяются в единую систематическую группу. Микробиология изучает прокариотные организмы – бактерии, а также определенные группы организмов эукариотного типа: дрожжевые и мицелиальные грибы, микроскопические водоросли, простейшие. Кроме того, микробиология изучает неклеточные формы жизни – вирусы. Все эти микроорганизмы объединены тремя общими признаками:

- Имеют чрезвычайно малые размеры, колеблющиеся от десятых долей до десятков, иногда сотен микрометров. Поэтому без увеличительных приборов микроорганизмы, за исключением отдельных, относительно крупных форм, не видны.
- Большинство микроорганизмов – одноклеточные существа. Встречаются и многоклеточные микроорганизмы, но дифференциация клеток у них отсутствует или выражена слабо. Вирусы не имеют клеточного строения.
- Мелкие размеры микробов определяют специфические, сходные для всех микроорганизмов технику культивирования и методы исследования, которые существенно отличаются от приемов, используемых при изучении растений и животных.

Человек с давних времен использует микробиологические процессы в практической деятельности. Многие микробиологические процессы применяют в пищевой промышленности. Так, в основе технологии приготовления хлеба лежат биохимические процессы спиртового и

молочнокислого брожения, возбудителями которых являются дрожжи и молочнокислые бактерии. Эти микроорганизмы обуславливают необходимую степень разрыхления и кислотность полуфабрикатов, вкус и аромат хлеба, способствуют улучшению качества изделий, повышению пищевой ценности. Микробиологические процессы лежат в основе технологии кисломолочных продуктов, приготовления квашеных овощей, пива, кваса, вина.

Наряду с полезными микроорганизмами существуют вредные, вызывающие нежелательные процессы. Такие микроорганизмы вызывают порчу пищевых продуктов и могут стать причиной пищевых отравлений и пищевых инфекций.

Дальнейшее развитие микробиологии как науки привело к выделению ряда самостоятельных разделов – общей, технической, медицинской, сельскохозяйственной, водной и санитарной микробиологии.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Начало развития науки о микроорганизмах обычно датируют с того момента, когда люди впервые увидели их. Первые научные описания микроорганизмов дал голландец А. Левенгук (1632 - 1723 гг.).

Левенгук не был профессиональным ученым. Шестнадцати лет он поступил учеником в мануфактурное торговое предприятие и впоследствии занял место кассира. Вопросы качества шерстяного волокна требовали употребления лупы. Левенгук увлекся трудной работой по отливке и шлифовке линз, изучал это ремесло в свободное от работы время и достиг большого совершенства в этом деле. Он делал лупы, дававшие увеличение до 300 раз, и вставлял их в латунную или серебряную оправу - так был создан микроскоп Левенгука. По существу - это простая лупа. Она превосходила по увеличению все лупы того времени.

Рассматривая при помощи лупы различные предметы: зубной налет, настой сена, Левенгук увидел живые, подвижные существа. С 1673 г. он начал публиковать свои наблюдения в форме писем в Лондонское королевское

общество. В 1683 году он представил первый рисунок с изображением внешней формы увиденных им существ и назвал их инфузориями от слова *infusum* - настой (рис. 1). В других письмах Левенгука были описаны дрожжи и плесневые грибы.

В 1698 году Петр I при посещении Голландии беседовал с Левенгуком, заинтересовался микроскопом и привез микроскоп в Россию. В мастерских при дворе Петра I в 1716 году были изготовлены первые в России простые микроскопы.

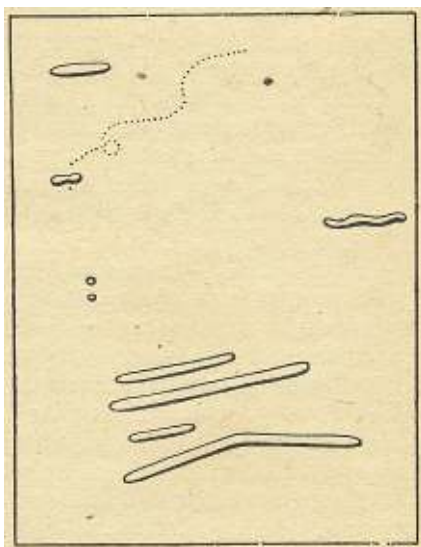


Рисунок 1. Бактерии из полости рта. Рисунок Левенгука (1683 г.)

Английский физик и изобретатель Роберт Гук (1635-1703 гг.) сконструировал в 1660 году новый тип микроскопа, представлявший сочетание двух систем линз - окулярной и объективной. В 1665 году он выпустил труд - «Микрография», где описал строение растений. Он установил ячеистое строение пробки, бузины, моркови. Ему принадлежит термин «клетка». Так началось изучение невидимых простым глазом структур тела растений и животных. Возникла наука - микрография.

По мере накопления сведений о микроскопических существах было выяснено, что они не так просты, как казалось первоначально, и весьма разнообразны.

Таким образом, было установлено существование мира микроорганизмов.

Огромная химическая деятельность микроорганизмов по переработке и минерализации растительных и животных остатков протекает так незаметно для глаза, что люди и не подозревали о их существовании. Однако отдельные

процессы, осуществляемые микроорганизмами, привлекли к себе внимание. С незапамятных времен людям были знакомы процессы гниения и брожения. Тысячелетиями человек пользовался в своем обиходе спиртовым брожением при приготовлении вина. Еще раньше было известно о молочнокислом брожении. Люди употребляли в пищу молочнокислые продукты, готовили сыр. При этом никто не подозревал, что имел дело с микроорганизмами. Не подозревали этого и алхимики, которые в средние века и позднее изучали гниение и брожение наряду с другими, чисто химическими процессами, такими, как взаимодействие металлов и кислот.

Слово «брожение» было дано голландским алхимиком Ван - Гельмонтом (1577-1641 гг.) процессам, идущим с выделением газа - fermentatio - кипение. Термин «газ» принадлежит также ему. В то время считали, что брожение - это химический процесс, идущий под влиянием частиц белка, которые легко распадаются сами и расшатывают молекулы, окружающих их веществ. Такая точка зрения была сформулирована в 1697 году Шталем (1660-1734 гг.), лейб-медиком прусского короля. Это представление господствовало 150 лет, пока не было опровергнуто Пастером во второй половине XIX века. Шталем же была сформулирована и теория флогистона. Последним приверженцем теории Шталя был Либих (1803-1873 гг.). Ему же принадлежит много работ по органической химии. В организованной им лаборатории учились и работали многие известные химики, в том числе и русские. Либих считал брожение и гниение контактными каталитическими реакциями. Дрожжи, по его мнению, и вообще все гниющие растительные и животные вещества переносят на другие тела то состояние разложения, в котором они сами находятся.



Л. Пастер (1823 – 1895)

Однако о природе брожения высказывались и другие соображения.

Французский физик Каньяр де Латур в 1836 году заметил, что осадок, образующийся при спиртовом брожении, которому приписывали роль катализатора, состоит из «способных к размножению шариков, которые, следовательно, живые существа, а не мертвое вещество, как полагали ранее». Благодаря их жизнедеятельности выделяется углекислота, а раствор сахара превращается в спиртовую жидкость.

Об этом же писал и немецкий альголог Кютцинг в 1837 году: «Весь процесс при спиртовом брожении зависит от образования дрожжей, при уксуснокислом брожении - от образования уксусной матки, слизистой массы, развивающейся в виде пленки на жидкости, содержащей спирт, из которой образуется уксус». Кютцинг полагал, что эта слизь состоит из мельчайших водорослей - *Ulvina aceti*.

Эта смелая мысль о связи процессов брожения с жизнедеятельностью живых существ была нова и неожиданна, но в течение многих лет не имела признания, что в значительной степени затруднялось благодаря исключительной популярности знаменитого Либиха и его химической теории брожения.

Основоположник современной микробиологии Луи Пастер (1822-1895 гг.), получивший в 32 года признание как выдающийся химик, организовал в Лилле естественно-исторический факультет и был назначен деканом. Химия входила в число наук, представленных на факультете.

Первые исследования Пастера были сделаны в области химии. Было известно, что существует винная кислота, вращающая плоскость поляризации и оптически недеятельная. Пастер обратил внимание на тот факт, что соли натрия или аммония недеятельной винной кислоты при перекристаллизации дают два типа кристаллов, которые являются зеркальным отражением друг друга. Пастер установил, что раствор одних вращает плоскость поляризации вправо, а раствор других - влево; раствор же смеси оптически недеятелен. Пастер открыл также, что выделить из рацемической смеси активный компонент может плесневый грибок, который использует один изомер и не затрагивает другой. Это наблюдение и привлекло внимание Пастера к микроорганизмам, изучению которых он посвятил в дальнейшем всю свою жизнь.

В 1856 г. Пастер обратил внимание на то, что образование молочной кислоты из сахара сопровождается накоплением размножающихся шариков. Он назвал их «молочнокислыми дрожжами». Слово «бактерии» было введено позднее Кохом.

Пастер показал, что если делать пересевы на 5%-ный раствор отвара дрожжей с 5% сахара и мела, то можно наблюдать образование молочной кислоты без участия белка. Белок лишь благоприятствует брожению, так как является подходящим веществом для питания микроорганизмов. Таким образом, Пастер точно определил, что молочнокислородное брожение - это результат жизнедеятельности микроорганизмов.

В 1857 году была опубликована работа Пастера, в которой сообщалось, что спиртовое брожение может протекать только в присутствии живых дрожжей и является результатом особой формы жизнедеятельности - без доступа воздуха. В дальнейшем Пастер натолкнулся на новые факты, имевшие громадное значение в развитии биологии.

Он заметил, что в чане, в котором закончилось молочнокислородное брожение и весь сахар превратился в лактат кальция, после некоторого периода затишья обнаруживается новый процесс. При обильном выделении газов раствор лактата изменяется: вместо молочной кислоты появляется масляная. Под микроскопом при этом Пастер обнаружил появление микроорганизмов новой

формы - цилиндрические прямые палочки с закругленными концами, которые быстро движутся, и поэтому Пастер назвал их «маленькими животными». Сейчас мы называем их маслянокислыми бактериями.

Пастер обнаружил, что это были совершенно особые организмы, не способные размножаться в присутствии воздуха. Таким образом, была открыта жизнь без кислорода - анаэробизм.

Изучая брожение, Пастер открыл, что микроорганизмы очень специфичны. Спиртовое брожение вызывают дрожжи, молочнокислое - - другой микроорганизм, маслянокислое - третий.

Пастер нанес сокрушительный удар господствовавшим в то время взглядам на брожение как на следствие гниения белковых веществ. Между Либихом и Пастером завязалась ожесточенная полемика. Эксперименты Пастера были настолько убедительны и точны, что после его работ химическая теория брожения отошла в прошлое.

В 1866 году Пастер опубликовал работу «Исследование вина», в которой доказал, что порча вин вызывается деятельностью микроорганизмов, вызывающих в них нежелательные брожения. Для борьбы с «болезнями» вин он предложил прогревать их до 55-60° С после того, как вино разлито в бутылки. Этот прием получил название «пастеризация».

От исследований «болезней брожений» Пастер перешел к исследованию болезней животных.

В 1866 году Пастер начал изучать болезни шелкопряда. Эти исследования были предприняты по просьбе шелководов, несших огромные убытки из-за гибели шелколических червей. Страдала вся промышленность юга Франции. Тщательные наблюдения привели Пастера к мысли, что заболевание вызывается микроорганизмами. Возбудителем заболевания оказался микроб *Microsporidia*, который образует пятна на поверхности тела гусеницы, и у последней перестает работать шелкоотделительная железа.

Пастер предложил отделять заболевших насекомых и уничтожать их. Это мероприятие возродило шелковую промышленность Франции.

Далее Пастер открыл, что одна из очень опасных болезней

сибирская язва - является следствием развития микроорганизмов в теле животного. Он обратил внимание на любопытный факт: если привить заразу курам, то они не заболевают. Но у кур более высокая температура тела, чем у животных или человека. Тогда он привил сибирскую язву курице и поставил ее ногами в холодную воду. Температура у курицы понизилась, и она заболела. Такой опыт, остроумный и крайне простой, очень характерен для стиля работы Пастера.

Затем Пастеру удалось культивировать возбудителя специфической болезни кур- куриной холеры вне тела хозяина, в бульоне. Он мог в любой момент вызвать заболевание, заражая кур бактериями. Возбудитель этого заболевания был назван впоследствии в честь Пастера - *Pasteurella*.

Однажды, случайно, Пастер произвёл заражение старой, ослабленной разводкой бактерий. Курица перенесла заболевание в легкой форме. После этого она приобрела невосприимчивость к этой болезни. Пастер усмотрел в этом не единичный случай, а решил, что введение ослабленной инфекции может быть общим методом для предохранения от тяжелых заболеваний.

Этот новый метод он решил проверить на сибирской язве. Для ослабления культуры применил нагревание.

Для популяризации нового метода предохранения от болезней Пастер в 1881 году провел свой знаменитый публичный опыт.

Для опыта было взято 50 овец, 25 из них он ввел ослабленную культуру - вакцинировал - как он назвал этот прием, по аналогии с введением оспенной вакцины Дженнера, предложенной еще в 1796 году. Затем он ввел всем 50 овцам смертельную дозу инфекционного начала. Опыт удался блестяще: 25 вакцинированных овец выжили, 25 не вакцинированных заболели и пали. Позже то же самое он доказал и для краснухи свиней.

После этих блестящих работ Пастер проводит исследования с одной из самых страшных болезней человека - бешенством, от которого не было спасения.

Однако на первых порах Пастер потерпел неудачу: он не мог получить вне организма активное заразное начало потому, что возбудитель бешенства - вирус - не культивируется вне живого тела.

Тогда Пастер ввел в мозг кролика растертый мозг бешеной собаки, что вызвало заболевание. Если переносить таким же образом заразное начало от кролика к кролику, то вирулентность возрастает, инкубационный период делается короче, пока не достигает 6 суток и далее он уже не сокращается; при перевивках получается «фиксированный вирус» - очень вирулентный для кроликов, но менее вирулентный для людей.

Пастер нашел способ ослабить инфекцию «фиксированного вируса» путем высушивания мозга кролика. С каждым днем хранения мозга над раствором едкого кали возбудитель все более и более терял вирулентность, то есть способность вызывать заболевание, и через 13- 15 дней становился безвредным для людей.

Если делать прививки людям таким обезвреженным вирусом и постепенно прививать все более активный препарат, то возникает невосприимчивость к бешенству.

Пастеру пришла идея не вакцинировать здоровых людей заранее, а попытаться лечить уже укушенных бешеным животным, потому что инкубационный период у бешенства довольно большой - от 20-30 дней до года.

После 5 лет опытов на животных в 1885 году Пастер решился сделать такую прививку двум укушенным людям. Результат был блестящий - они выжили.

Это была вершина в научной деятельности Пастера. Такие прививки, как известно, получили всемирное распространение. Во всех странах появились Пастеровские станции, где имеются вакцины и делаются прививки.

В России первая Пастеровская станция была открыта в 1886 году известным русским микробиологом Н. Ф. Гамалея (1859-1949 гг.).

В 1888 году для Пастера был построен исследовательский институт в Париже на средства, собранные по международной подписке. Пастер был первым его директором.

Таким образом, можно сказать, что основоположником микробиологии как науки был Пастер. Своими работами он заложил фундамент для общей и для медицинской микробиологии, которые с тех пор начали быстро развиваться и в XX веке сформировались в две самостоятельные научные дисциплины.

Пастер совершенно уникальный ученый, сделавший так много крупных открытий, как мало кому удавалось во всей истории мировой науки. Своими работами он сформировал целую обширную науку, которой до него практически не существовало. Он был настолько наблюдателен, что предвосхитил много направлений в чрезвычайно разнообразной современной микробиологии. Его опыты отличались необычайной простотой и остроумием и были так точны, что никогда, никто не мог опровергнуть ни одного из них.

Дальнейшее развитие микробиологии после Пастера выявляло все новые и новые химические процессы, осуществляемые микроорганизмами. Теперь мы знаем, что микроорганизмы в природе ведут огромную химическую работу, превращая одни вещества в другие, обеспечивая такой круговорот веществ на Земле, который делает возможной жизнь на планете. Описание этих химических процессов и их возбудителей и составляет предмет современной микробиологии.

После работ Пастера наибольшее внимание привлекли вопросы медицинской бактериологии благодаря блестящим работам врачей Р. Коха и И. И. Мечникова.



R. Koch (1843 – 1910)

Роберт Кох (1843-1910 г.) - немецкий врач, занимался бактериологией в условиях домашней лаборатории. Его деятельность была направлена на выявление и изучение возбудителей болезней. Он разработал метод получения чистых культур микроорганизмов, который был основан на получении колоний

на твердой среде. Для получения твердых сред он впервые применил желатин. Им созданы методы окраски бактериологических препаратов, которыми пользуются до сих пор. Культивируя бактерии сибирской язвы, Кох открыл, что они образуют споры. Он открыл и выделил возбудителей холеры и туберкулеза. Наконец, Кох сформулировал требования - триаду, из которых и в настоящее время исходят при решении вопроса о том, является ли микроб возбудителем заболевания:

- 1) микроб должен встречаться при данном заболевании и отсутствовать при других;
- 2) должна быть получена чистая культура микроорганизма;
- 3) при помощи выделенного организма необходимо вызвать данное заболевание у восприимчивого здорового животного



И. И. Мечников (1845 – 1916)

После выдающихся работ Коха медицинская микробиология сформировалась как самостоятельная наука.

И. И. Мечников (1845-1916 г.) - русский биолог, зоолог беспозвоночных - был очень разносторонним ученым, работавшим также и с патогенными микроорганизмами. Центральной проблемой в его работах было изучение взаимоотношений микроба-паразита и хозяина.

Ему принадлежит идея, что воспаление - это приспособительная реакция, выработанная животным организмом для борьбы с патогенным микробом, при этом микробы поглощаются лейкоцитами и уничтожаются ими.



М. Бейеринк (1851 – 1931)

Взаимоотношения клеток тела хозяина и микроба Мечников изучал со сравнительно-эволюционной точки зрения. У низших животных функция поглощения клеток микроба связана с внутриклеточным пищеварением. Рассмотрение функций в сравнительно-эволюционном разрезе - это то новое, что внес Мечников в биологию. Он занимался также и практической бактериологией, изучал возбудителя холеры и даже прибегнул к самозаражению. После смерти Пастера был директором Пастеровского института.



С. Н. Виноградский (1856 – 1953)

Другая ветвь микробиологии - общая микробиология, которая изучает микроорганизмы почв и вод и их возможное практическое использование, развивалась в трудах ученых, так или иначе связанных с химией.

В развитии этой ветви микробиологии - общей микробиологии - огромную роль сыграл М. Бейеринк (1851-1931 гг.) основатель первой крупной лаборатории общей микробиологии в Дельфте (Голландия). Ему принадлежит огромное количество исследований различных групп почвенных и водных микроорганизмов. Им впервые получено в чистом виде и описано большое число видов. Он изучал химические превращения, которые они способны осуществлять.

Вопросы морфологии и систематики микроорганизмов впервые подверглись подробному изучению в работах Ф. Кона (1828 - 1898 гг.).

С. Н. Виноградский (1856-1953 гг.) был крупнейшим русским микробиологом, создавшим эпоху в развитии общей микробиологии.

Он руководил отделом общей микробиологии в Институте экспериментальной медицины в Петербурге с 1891 по 1912 год, а с 1922 года заведовал агробактериологическим отделом Пастеровского института под Парижем. Наиболее значительным среди его работ было открытие хемосинтеза у бактерий, т. е. способности некоторых специфических бактерий жить за счет окисления аммиака, сероводорода, закисного железа, не нуждаясь в органическом веществе и синтезируя вещества тела из углерода углекислоты.

Много лет С. Н. Виноградский изучал микробное население почвы. Его по праву считают основоположником почвенной микробиологии".

Учеником и сотрудником С. Н. Виноградского был В. Л. Омелянский (1867-1928 гг.), работавший в самых различных областях общей микробиологии. Он создал первый русский учебник «Основы микробиологии», изданный в 1909 году и выдержавший 9 изданий за последующие 30 лет. Омелянским же составлено и первое русское практическое руководство по микробиологии, не утратившее до сих пор своей ценности.



В. Л. Омелянский (1867 – 1928)

В 20-30-е гг. XX века из науки в значительной степени описательной общая микробиология стала превращаться в науку экспериментальную. Она стала все теснее переплетаться с химией и биохимией. От выделения из природы и описания микроорганизмов перешли к изучению их физиологии. Встали вопросы о том, откуда микробы черпают энергию для жизни. Это сложный биохимический вопрос. Еще более сложная проблема - как они строят свое тело.

Этот последний этап развития микробиологии связан с именами ряда крупных современных микробиологов.

Биохимик Клюйвер (1888-1956 п.) с 1921 г. заведовал лабораторией общей и прикладной микробиологии в Дельфте, основанной Бейеринком. В своих исследованиях он особенно большое внимание уделял химической деятельности микроорганизмов и биологическому окислению. Клюйвер впервые обратил внимание на то, что этот процесс всегда сопровождается восстановлением. Он изучал биохимию многих процессов, осуществляемых микроорганизмами, особенно бродильных. Основная идея в его работах – это утверждение единства биохимических процессов у всех живых существ.

Ван Ниль, современный американский микробиолог-физиолог, ученик Клюйвера, изучал обмен веществ у микроорганизмов. Особенно известны его исследования бактериального фотосинтеза у пурпурных и зеленых серобактерий.

В СССР биохимическое направление в изучении микроорганизмов начало развиваться очень рано.

А. Н. Лебедев и Л. А. Иванов изучали химизм спиртового брожения, опередив аналогичные исследования в Европе. Особенно широкий круг вопросов микробиологии был затронут в работах физиолога растений С. п. Костычева (1877-1931 п.). Ему принадлежат классические исследования по химизму спиртового брожения. С. П. Костычев изучал обмен веществ у грибов и организовал первое в СССР производство лимонной кислоты при помощи плесневого гриба. Известны его исследования и в области почвенной микробиологии. Он заведовал кафедрой физиологии растений в Ленинградском университете и был директором Института сельскохозяйственной микробиологии.

В. Н. Шапошников - основоположник технической микробиологии в СССР. Изучая физиологию бродильных организмов, он смог организовать и усовершенствовать ряд бродильных производств в России: молочной, масляной, уксусной кислот, ацетона и бутанола.

Экологическое, описательное направление разрабатывалось Б. Л. Исаченко (1871-1948 п.). Он работал в разных областях микробиологии, но особенно известны его исследования микрофлоры Северного Ледовитого океана и других водоемов.

После того как Пастер заложил основы микробиологии, начались многочисленные исследования, которые можно охарактеризовать следующим образом: что делают те или другие микробы. Этот этап накопления фактов длился до начала XX века. Частично такие исследования ведутся и до сих пор.

Когда накопилось значительное количество сведений о мире микроорганизмов, встал вопрос - как микроорганизмы осуществляют химические превращения, как протекают брожения, каков их химизм. Это уже вопросы биохимии. Начался биохимический период в развитии микробиологии. Впервые этот вопрос решался при изучении спиртового брожения, а затем и применительно к другим брожениям и превращениям веществ у микробов. Это биохимическое направление сейчас достигло своего расцвета. При этом выяснилось, что у растений, животных и микроорганизмов биохимические

механизмы получения энергии и синтеза веществ тела удивительно похожи, часто даже идентичны. В то же время микроорганизмы оказались необычайно разнообразны. Но разнообразие это особого свойства. Было замечено, что какой-либо процесс, общий для микробов и животных, у отдельных микроорганизмов может протекать особенно интенсивно по сравнению с другими, одновременно протекающими процессами. Таким образом, у микроорганизмов мы находим необычайно разнообразные вариации основных процессов, в основе своей общих во всех царствах природы. Это и отличает микробный обмен от обмена высших организмов, и одновременно - сближает. Сначала особенно бросилась в глаза общность обмена веществ во всем живом, и вначале ее искали и подчеркивали. В настоящее время, когда общность принципов метаболизма не оставляет сомнения, следует искать те различия, то специфическое, что встречается только у микроорганизмов.

Общность основных процессов обмена веществ у микробов растений и животных привлекла к микробиологии внимание биохимиков растений и биохимиков животных. Микробы оказались исключительно удобными объектами для биохимических исследований. Они быстро растут, быстро образуют большие количества конечных и промежуточных продуктов обмена. Особенно ценны микроорганизмы для генетических исследований, так как у микроорганизмов необычайно быстро сменяются поколения.

За последние 2-3 десятилетия микробиология необычайно быстро продвинулась вперед. В настоящее время широко используются микроорганизмы для практических нужд человечества. Возникло множество химических производств, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Биохимическое изучение микроорганизмов выясняет механизмы химических превращений веществ, приводящих к получению микробом энергии, необходимой для синтеза веществ тела, и механизмы этого биосинтеза. Но этим не исчерпывается задача исследования микроорганизмов. Встает вопрос: зачем протекает тот или иной процесс превращения одних веществ в другие, то есть каков его биологический смысл. Это уже вопрос физиологии. Физиологическое исследование микроорганизмов - это изучение взаимосвязи отдельных биохимических процессов, изучение их сочетания и

саморегулирования, их реакции на изменение внешних условий. Всякое превращение веществ микроорганизмами осуществляется в каких-то определенных внешних условиях и зависит от них. Обмен веществ не только затухает при неблагоприятных внешних условиях, но изменяется, и при том таким образом, чтобы обезвредить их неблагоприятное действие. Это происходит потому, что в биохимических превращениях, в процессе эволюции развился принцип обратной связи, который приводит к известной автоматизации реакции на внешние условия.

Физиологический этап в развитии микробиологии - это наивысший современный ее этап. Отдельные исследования в этом направлении ведутся уже давно.

Всестороннее изучение микроорганизмов - их распространения, биохимии, физиологии и тех химических изменений, которые они производят в среде в результате своей жизнедеятельности, приведет к тому, что человечество получит в свои руки ключ к сознательному управлению микробными процессами. Управление обменом веществ позволит (и уже теперь в известной мере позволяет) широко использовать в хозяйственной деятельности микроорганизмы как исключительно мощные и целенаправленные химические реагенты.

Если микроорганизм образует какой-нибудь ценный продукт из легкодоступного сырья, то знание биохимии и физиологии позволит заставить его образовывать этот продукт особенно быстро и особенно обильно. Реальным примером является промышленность антибиотиков.

Уже после того, как стало известно, что образуют те или другие микроорганизмы, можно было начать налаживать производство интересующего продукта. Но только с выяснением того, как идет биосинтез (биохимия биосинтеза) и как это зависит от внешних условий (физиология продуцента), становится возможным полностью поставить на службу потенциальную химическую активность микроорганизма.

ЧАСТЬ I

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ И ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 1

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП

Морфология микроорганизмов изучает форму и строение их клеток, способы передвижения и размножения. Микроорганизмы различаются по внешнему виду и по размерам. Строение клеток микроорганизмов также различно, в связи с чем они относятся к различным систематическим группам.

Все живые организмы на Земле, имеющие клеточное строение, делят на два надцарства: прокариоты и эукариоты. Это деление живых организмов основано главным образом на особенностях строения ядерного аппарата. В клетках прокариот ядро отсутствует. Ядерный аппарат их представлен молекулой ДНК, расположенной в ядерной зоне непосредственно в цитоплазме. Клетки эукариот имеют ядро, отделенное от цитоплазмы двойной ядерной мембраной.

БАКТЕРИИ

Известно около 4000 видов бактерий. Их разнообразие особенно выражено в отношении физиолого-биохимических свойств. В определенной степени оно проявляется и в морфологии.

Величина клеток различных бактерий сильно варьирует. Размеры многих бактериальных форм находятся в пределах 0,5-10 мкм. Однако величина ряда бактерий не укладывается в эти границы. Среди них есть немало относительно крупных форм, есть и крайне мелкие формы. Значительной длины достигают, например, нитчатые бактерии рода *Beggiatoa* - до 60 мкм и более и *Saprospira* - до 500 мкм. Это одни из наиболее крупных бактерий. Гигантские формы встречаются среди спирохет: длина некоторых достигает 500 мкм. Мельчайшие из известных организмов клеточного строения – микоплазмы. Размеры отдельных форм микоплазм не превышают 0,1-0,2 мкм, что лежит на границе или даже за пределами разрешающей способности светового микроскопа. У одного и того же вида бактерий размеры клеток могут в большей или меньшей степени

варьировать в зависимости от возраста культур и (или) от условий культивирования. У многих бактерий особенно заметно меняется длина клетки. Диаметр клеток является более устойчивым признаком.

Основная масса бактерий - одноклеточные организмы. Но нередко клетки после деления не расходятся и образуют сочетания различной формы, которая определяется расположением делящей перегородки. Эти сочетания не равноценны многоклеточным организмам, так как каждая клетка в них автономна и может существовать самостоятельно после отделения от остальных клеток.

Бактерии, за исключением микоплазм, имеют определенную форму клетки. У большинства бактерий она поддерживается благодаря прочной (ригидной)

клеточной стенке. Клеточная стенка спирохет эластична, и их извитая форма поддерживается с помощью аксиальных фибрилл, расположенных под клеточной стенкой. Форма клетки многих бактерий отличается постоянством и сохраняется в течение всей жизни. Но есть бактерии, у которых наблюдается более или менее выраженный плеоморфизм. Нередко он отражает стадии цикла развития микроорганизма. В этом случае обнаруживается упорядоченное, регулярное чередование определенных форм. Изменения морфологии могут происходить и под влиянием условий культивирования. Полиморфность микоплазм связана с отсутствием у них клеточной стенки.

Морфологические типы бактерий по сравнению с высшими организмами немногочисленны. Клетки значительной части бактерий имеют сферическую, цилиндрическую или спиралевидную форму. Существует обширная группа ветвящихся бактерий, сравнительно небольшое количество нитчатых форм и бактерий, образующих выросты (простеки).

Сферические бактерии - кокки. Под микроскопом они имеют форму шара. Многим коккам свойственно образование различных сочетаний (рис. 2). Кокки, делящиеся в одной плоскости и одном направлении, могут образовывать пары (диплококки) или цепочки (стрептококки) клеток. Когда деление происходит равномерно в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, возникают группы

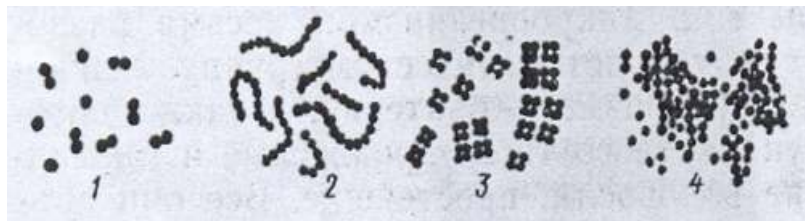


Рисунок 2. Сочетания кокков: 1 – диплококки; 2 – стрептококки; 3 – тетракокки и сарцины; 4 – стафилококки и микрококки

из четырех клеток – тетракокки, а если в трёх, то образуют пакеты правильной формы – сарцины. При неравномерном делении в нескольких плоскостях наблюдаются скопления неправильной формы, напоминающие гроздь винограда. Они свойственны представителям стафилококков и микрококков. Микрококками часто называют и одиночные шаровидные клетки.

Под влиянием различных факторов среды некоторые кокки могут превращаться в овальные, конические и эллипсоидные клетки.

Цилиндрические (палочковидные) бактерии под микроскопом имеют вид палочек. Это одна из наиболее многочисленных групп бактерий. Разные виды могут заметно отличаться друг от друга размерами клеток. Одной из самых крупных палочковидных бактерий является *Bacillus megaterium*. Ее длина 5-10 мкм, поперечник около 1 мкм. К наиболее коротким относятся риккетсии, размеры которых могут быть всего 0,3 X 1,0 мкм. В тех случаях, когда длина лишь ненамного превышает диаметр клетки, палочки трудно отличить от кокков. Концы палочек бывают прямыми, округлыми или заострёнными (рис. 3).

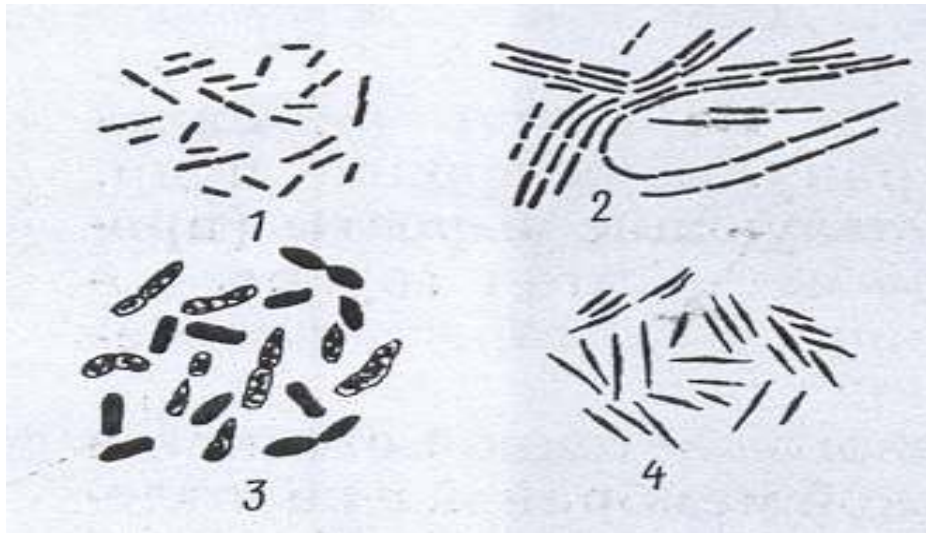


Рисунок 3. Палочковидные бактерии: 1 - *Pseudomonas aeruginosa*; 2 - *Bacillus mycoides*; 3 – *Bacillus megaterium*; 4 – *Cytophaga*

Палочковидные бактерии нередко образуют пары или цепочки клеток. Парные сочетания клеток наблюдаются, например, у определенных видов рода *Pseudomonas*, длинные цепочки можно увидеть в культуре *Bacillus mycoides*. Для ряда палочковидных бактерий характерен выраженный плеоморфизм.

Изменение формы, связанное с развитием бактерий, наблюдается у видов *Azotobacter* и *Rhizobium*; у миксобактерий и риккетсий. Так уже в молодой культуре азотобактера можно видеть клетки не только палочковидной, но и овальной или кокковидной формы. Они часто соединяются попарно или образуют скопления, а иногда цепочки из 4 и более клеток. В старых культурах преобладают крупные округлые, неправильной формы покоящиеся клетки-цисты. Риккетсии, помимо коротких палочек длиной 1-1,5 мкм могут быть представлены кокками диаметром менее 0,5 мкм, длинными палочками - 3-4 мкм, или причудливо изогнутыми нитями, длина которых достигает 40 и более микрометров. Есть бактерии, у которых изменение формы клетки связано со спорообразованием.

В неблагоприятных условиях в культурах многих палочковидных бактерий возникают различные дегенеративные формы с признаками лизиса, гранулированием содержимого, большими вакуолями и др. Это можно наблюдать, например, в культуре *Bacillus megaterium* (рис. 3).

Извитые одноклеточные бактерии бывают трех типов: вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы выглядят как слегка изогнутые палочки, похожие на запятую (рис. 4). В процессе развития некоторые из них могут менять форму клеток. Так, паразиты бактерий *Bdellovibrio* при развитии в периплазматическом пространстве клетки хозяина становятся спиралевидными. Впоследствии спиралевидные клетки распадаются на вибрионы. Спириллы похожи либо на латинскую букву S, либо на штопор, т. е. имеют несколько правильных завитков. Спирохеты имеют вид тонких спиралевидных клеток с многочисленными завитками и петлями. Длина клеток спирохет превышает толщину в 5 - 200 раз. Спирохеты нередко образуют аномальные формы - гранулы, сфероиды и др.

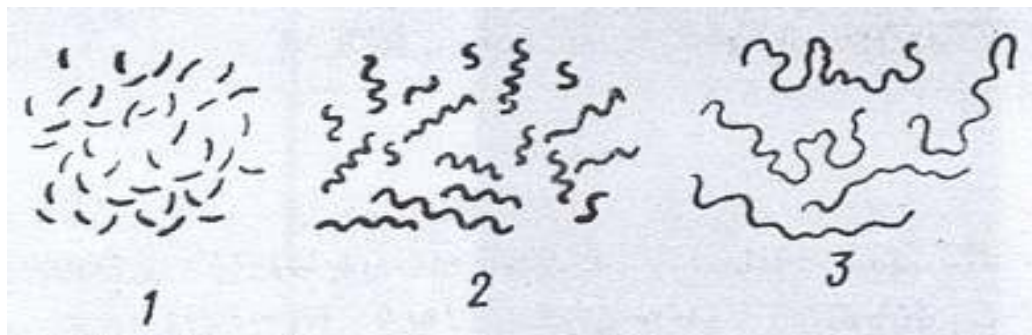


Рисунок 4 Извитые формы: 1 – вибрионы; 2 – спириллы; 3 – спирохеты

Бактерии, образующие выросты (простеки). Основную часть этой группы составляют бактерии, у которых простеки - это выпячивания клеточного содержимого, окруженного клеточной стенкой цитоплазматической мембраной и не отделенного от клетки перегородкой. У одних бактерий, например у видов рода *Nuphromicrobium*, образование выростов связано с размножением. Клетки представителей этого рода чаще имеют вид палочек с заостренными концами, но бывают также овальной, яйцеобразной или бобовидной формы. Нитевидные выросты образуются на одном или обоих полюсах клетки. Выросты могут ветвиться, давая гифоподобные структуры. На конце каждой ветви формируется почка, являющаяся дочерней клеткой. Иногда созревшие почки не отделяются от материнской клетки и тоже образуют выросты и почки. Тогда возникает скопление гиф и клеток (рис. 5).

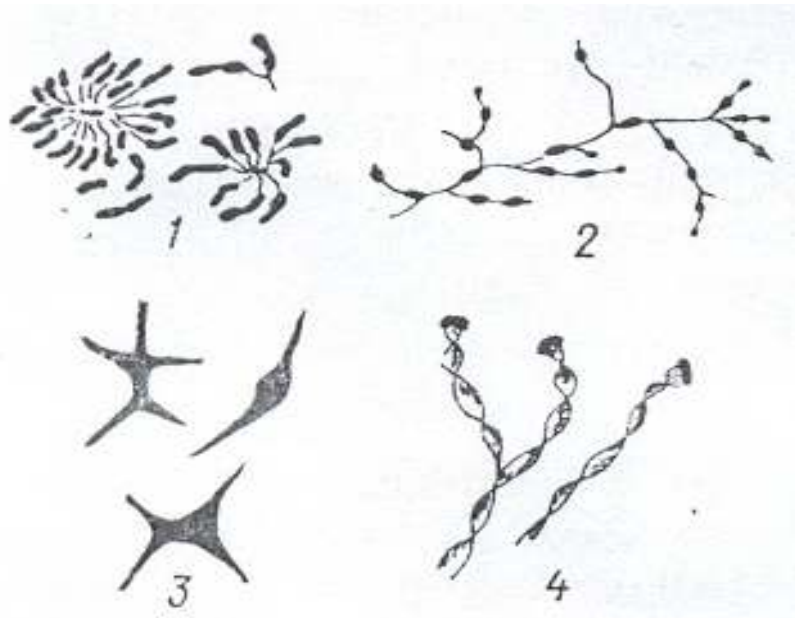


Рисунок 5 Бактерии, образующие выросты: 1 – *Caulobacter*; 2 – *Hyphomicrobium*; 3 – *Ancalomicrobium*; 4 – *Gallionella*

У других бактерий простеки не имеют отношения к размножению. К таким бактериям принадлежат, например, виды рода *Caulobacter* и *Ancalomicrobium*. Клетки *Caulobacter* – это слегка изогнутые палочки с одним полярным жгутиком. Сравнительно короткий вырост - стебелек возникает на одном полюсе клетки. На конце стебелька имеется небольшое утолщение из липкого материала - фиксатор. С его помощью клетки прикрепляются к какому-либо субстрату, а иногда друг к другу. В последнем случае образуются характерные скопления. У видов *Ancalomicrobium* на клетке неправильной формы возникает несколько простеков - от 2 до 8. Клетка приобретает причудливый звездообразный вид.

Иногда к стебельковым относят бактерии, образующие слизистые придатки, не связанные с цитоплазмой клетки. Это, например, виды *Gallionella*, бобовидные клетки которой выделяют с вогнутой стороны слизь в виде тонкой нити. Под микроскопом такая нить выглядит как спирально изогнутая лента.

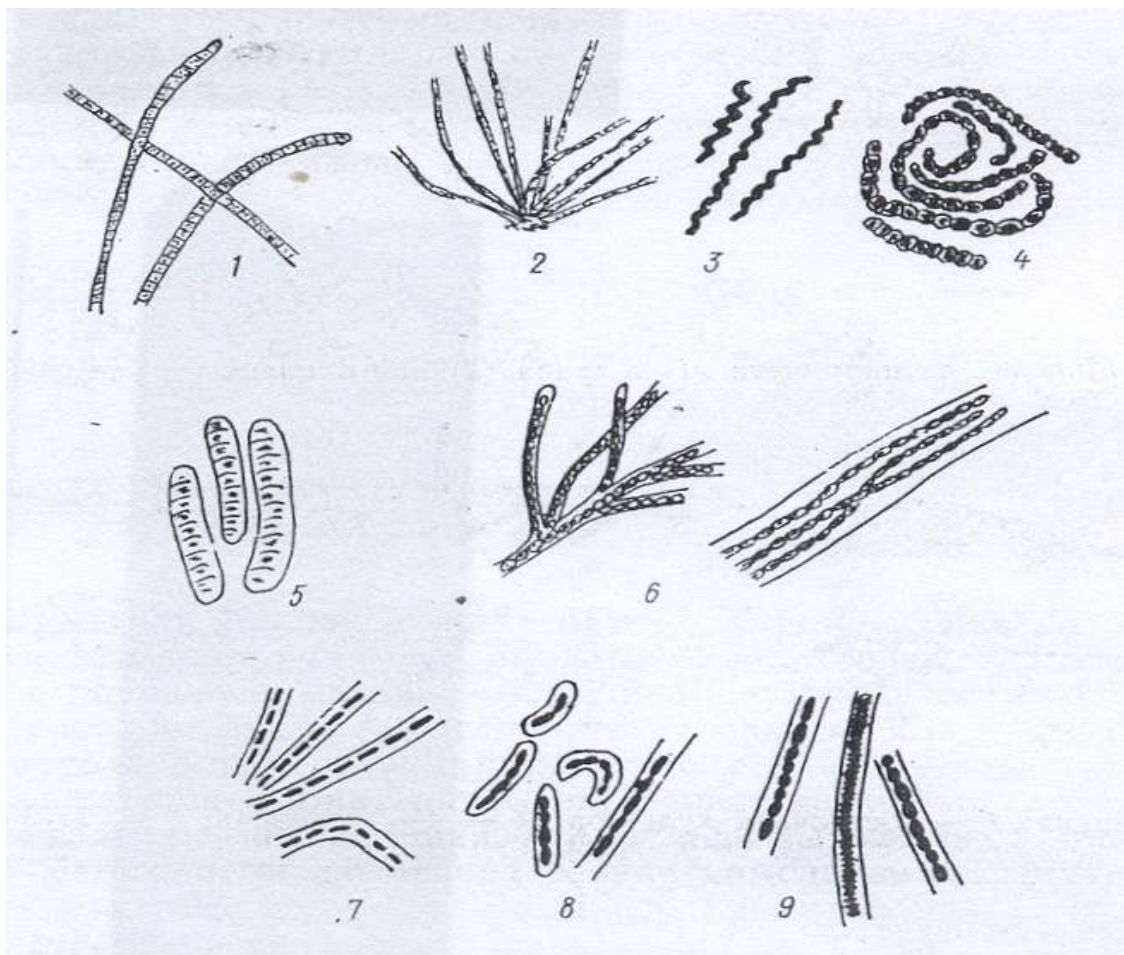


Рисунок 6. Нитчатые бактерии: 1 - *Beggiatoa*; 2 - *Thiothrix*; 3 - *Saprospira*; 4 - *Simonsiella*; 5 - *Caryophanon*; 6 - цианобактерии класса *Hormogoneae*; 7 - *Leptothrix*; 8 - *Sphaerotilus*; 9 - *Crenothrix*

Нитчатые бактерии. Это сравнительно небольшая группа многоклеточных организмов. Они представляют собой цепочки (трихомы) из цилиндрических, овальных или дисковидных клеток. Типичными представителями нитчатых форм являются бактерии родов *Beggiatoa* и *Thiothrix* (рис.6). Их нити имеют равную толщину на всем протяжении. Трихомы видов *Thiothrix* собраны в пучки и прикрепляются основанием к субстрату. Нити *Leucothrix*, подобно *Thiothrix*, большей частью также растут пучком, прикрепляясь к твердой поверхности, но, в отличие от *Thiothrix*, они сужаются к концу.

Трихомы видов *Saprospira* скручены в виде спирали, а у видов *Simonsiella* они уплощены и похожи на ленты. У видов *Caryophanon* поперечные клеточные стенки большинства составляющих нити клеток не сплошные, так как их формирование отстает от роста трихома. Нитчатые бактерии относятся к крупным микроорганизмам. Так, длина нитей некоторых представителей рода

Caryophanon достигает 40 мкм, а толщина 4 мкм. Нити зеленых бактерий группы *Chloroflexus* могут иметь длину 300 мкм. Особенно длинные трихомы образуют, как уже отмечалось, виды *Beggiatoa* и *Saprospira* (до 500 мкм).

Ветвящиеся бактерии. К этой многочисленной группе относятся истинные актиномицеты, нокардии, микобактерии, коринеподобные бактерии и ряд других организмов. Истинные актиномицеты имеют сильно разветвленный мицелий, сохраняющийся в течение всей жизни, что делает их внешне сходными с мицелиальными грибами (рис. 7). Однако общая длина нитей актиномицетов обычно не превышает нескольких миллиметров, а толщина составляет всего 0,5-1,5 мкм, тогда как длина грибного мицелия достигает нескольких сантиметров, а диаметр может быть около 50 мкм. У представителей рода *Streptomyces* в мицелии образуются перегородки, но их мало, поэтому составляющие его клетки в основном многоядерные. Мицелий большинства актиномицетов лишен перегородок, и этим он напоминает многоядерный несептированный мицелий фикомицетов.

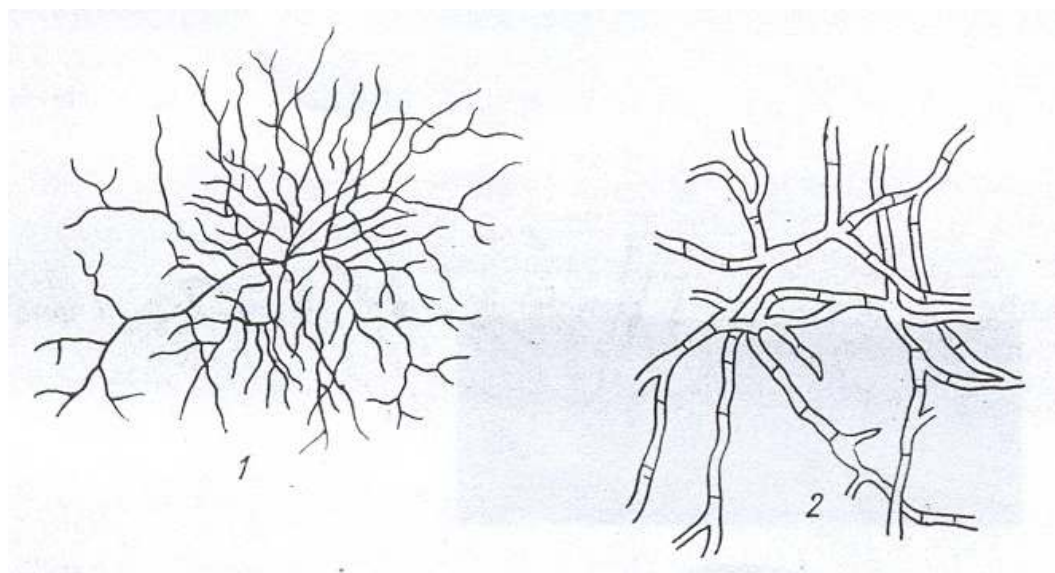


Рисунок 7. Мицелий актиномицета (1) и гриба (2) при одинаковом увеличении

У нокардий и микобактерий мицелиальный тип развития имеет временный и часто ограниченный характер. Виды рода *Nocardia* образуют обильный, недифференцированный мицелий на начальных стадиях развития. В дальнейшем он распадается на палочковидные или сферические фрагменты.

Микоплазмы. Это довольно большая группа бактерий, у которых нет клеточной стенки. Поэтому они очень полиморфны. В культуре одного вида можно одновременно обнаружить мелкие зерновидные образования, кокковидные, эллипсовидные, грушеобразные, дисковидные, палочковидные и даже разветвленные и неразветвленные нитевидные формы (рис. 8). Размеры крупных клеток микоплазм достигают 10 мкм, а величина мелких структур не превышает 0,1 мкм.

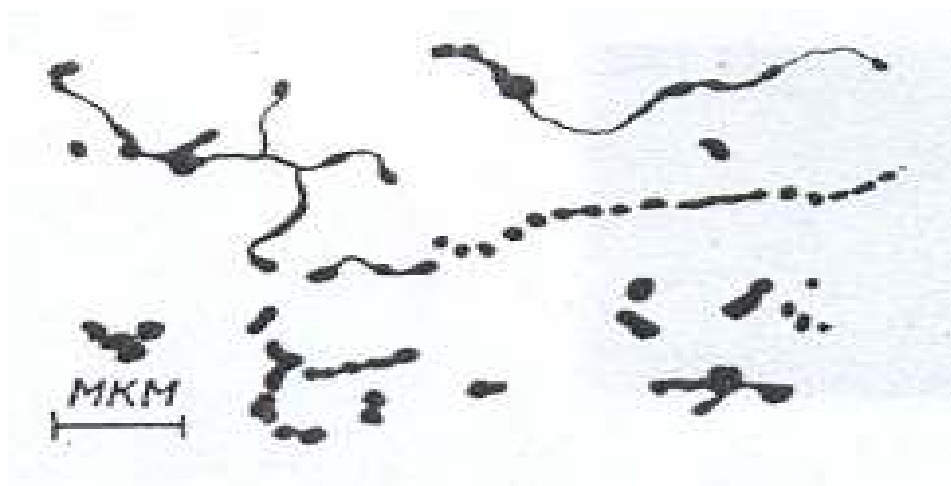


Рисунок 8. Микоплазмы. Схема электронной микрофотографии

Большинство бактерий размножаются путем бинарного поперечного изоморфного деления. Такой способ размножения свойствен коккам, многим палочковидным формам и вибрионам, спириллам, спирохетам, некоторым нитчатым бактериям. Клетки основной массы бактерий делятся в одной плоскости. У многих кокков деление происходит в нескольких плоскостях. Расходящиеся после деления клетки большинства бактерий располагаются одна за другой или беспорядочно, а у видов *Arthrobacter* и *Corynebacterium* под углом друг к другу. Если после деления клетки не расходятся, то наблюдается образование различных скоплений клеток - пар, цепочек, пакетов и другие. В ряде случаев имеет место неравномерное деление. Фрагментацией мицелия или его рудиментов на палочки и кокки размножаются, например, виды *Nocardia* и *Mycobacterium*. Размножение распадом нитей на участки наблюдается у *Beggiatoa* и *Saprospira*. Две неодинаковые клетки - одна подвижная со жгутом, но без простеки, а

другая неподвижная без жгутика, но со стебельком - образуются при делении клеток *Caulobacter* (рис. 9). К делению способны только неподвижные клетки с простекой.

Некоторые бактерии (виды *Hyphomicrobium* и *Rhodopseudomonas*, *Ancalomicrobium* и др.) размножаются почкованием. У *Rhodopseudomonas* и *Ancalomicrobium* почки формируются прямо на поверхности клеток, а у *Hyphomicrobium* - на концах гиф.

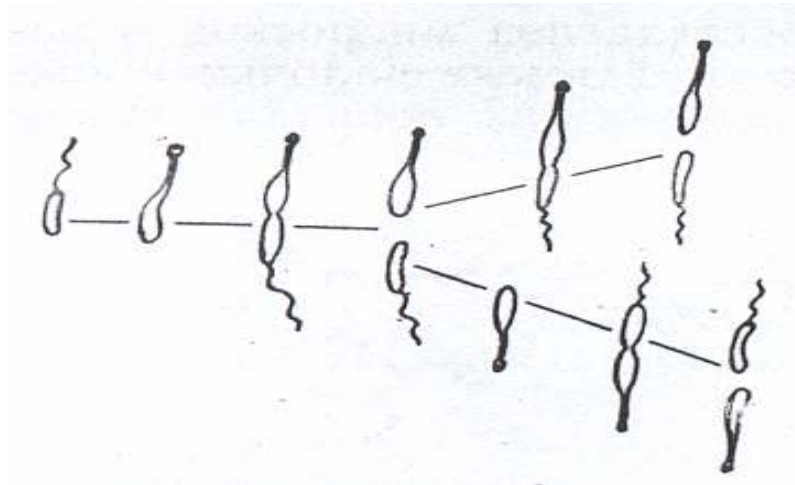


Рисунок 9. Схема роста и деления клеток *Caulobacter*

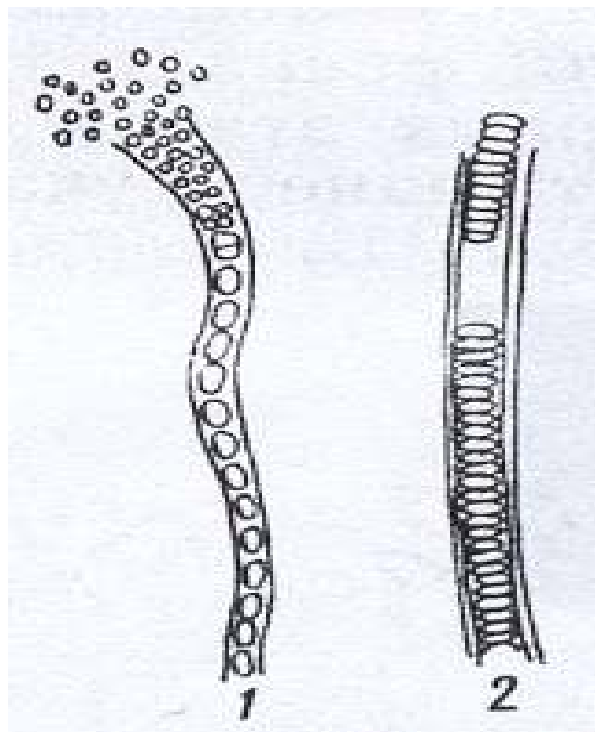


Рисунок 10. Гонидии (1) и гормогонии (2) нитчатых бактерий

У бактерий известны и более сложные способы размножения. Нитчатые цианобактерии класса *Chamaesiphoneae* и бактерии родов *Thiothrix*, *Caryophanon*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Leucothrix* размножаются с помощью специальных репродуктивных одиночных подвижных клеток - гонидий

(рис. 10), которые образуются в результате многократного деления концевых клеток нити. Подвижность гонидий связана с наличием у них жгутиков. Для нитчатых цианобактерий класса *Hormogoneae* характерно размножение гормогониями. Это короткие цепочки, возникающие, как и гонидии, при делении клеток нити. Они не имеют жгутиков и перемещаются скольжением благодаря выделению слизи. Размножение гормогониями наблюдается также у видов *Leucothrix*.

Актиномицеты размножаются главным образом подвижными или неподвижными спорами (конидиями). Конидии располагаются поодиночке или цепочками, непосредственно на мицелии, на концах спороносящих гиф - спорангиеносцах (спорангиофорах) или в специальных органах спороносения - спорангиях. Спорангиеносцы (и соответственно цепочки спор) разных видов различаются между собой. Они могут быть длинными или короткими, прямыми, волнистыми или спиралевидными; иметь последовательное, супротивное или мутовчатое расположение (рис. 11). Спорангии бывают сферической или неправильной формы (рис. 12), в них формируются эндогенные споры.

Существует немало бактерий, которые могут размножаться несколькими способами. Например, представители рода *Rhizobium* размножаются делением и почкованием, актиномицеты - спорами и кусочками вегетативного мицелия. Нитчатые цианобактерии размножаются гонидиями или гормогониями, а также путем распада трихома на отдельные участки, бактерии рода *Chloroflexus* - бинарным делением и участками нити. *Caryophanon* и *Sphaerotilus* - с помощью гонидий и поперечным изоморфным делением трихома, *Leucothrix* гонидиями и гормогониями. У микоплазм можно наблюдать бинарное деление, фрагментацию нитей и крупных клеток до кокков, а также процесс, напоминающий почкование.

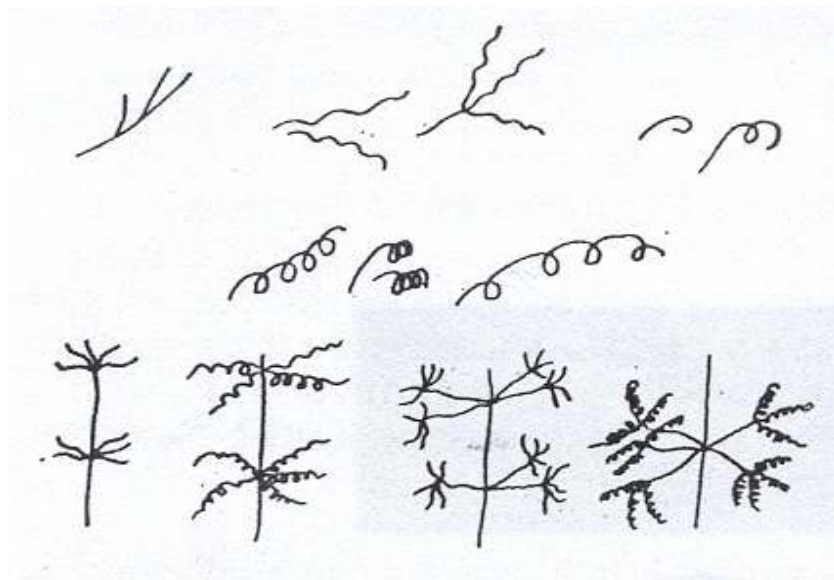


Рисунок 11 Форма воздушных спороносцев у актиномицетов

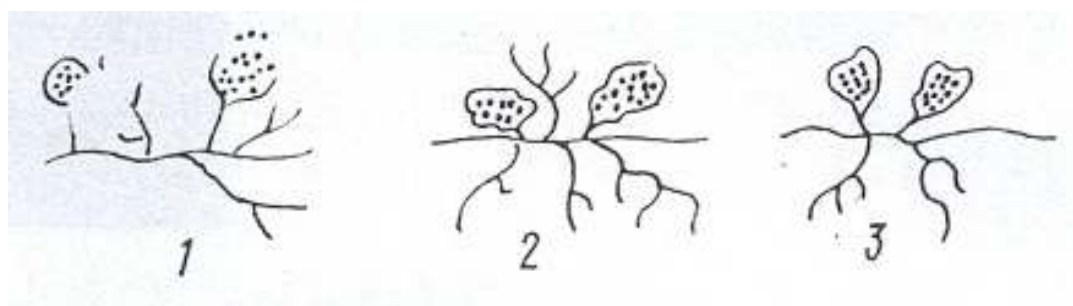


Рисунок 12. Спорангии актиномицетов: 1 – *Actinoplanes*; 2 – *Amorphosporangium*; 3 - *Spirillospora*

Многие бактерии неподвижны. Неподвижными являются почти все кокки, более 50% палочковидных бактерий, почкующиеся и ветвящиеся бактерии, значительная часть нитчатых форм, риккетсии, микоплазмы. Способностью к движению обладает примерно 1/5 часть бактерий. Подвижность большинства из них обусловлена наличием специальных локомоторных структур - жгутиков. Жгутики обнаруживаются у некоторых кокков (отдельные представители рода *Methylococcus*), ряда палочковидных бактерий (виды *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Escherichia* и др.), у вибрионов и спирилл, у нитчатых бактерий рода *Caryophanon*. У бактерий некоторых групп специальные репродуктивные клетки со жгутиками появляются только в определенной стадии развития. Это подвижные клетки каулобактерий, гонидии большинства нитчатых организмов, споры (конидии) некоторых актиномицетов (виды *Actinoplanes* и *Geodermatophilus*).

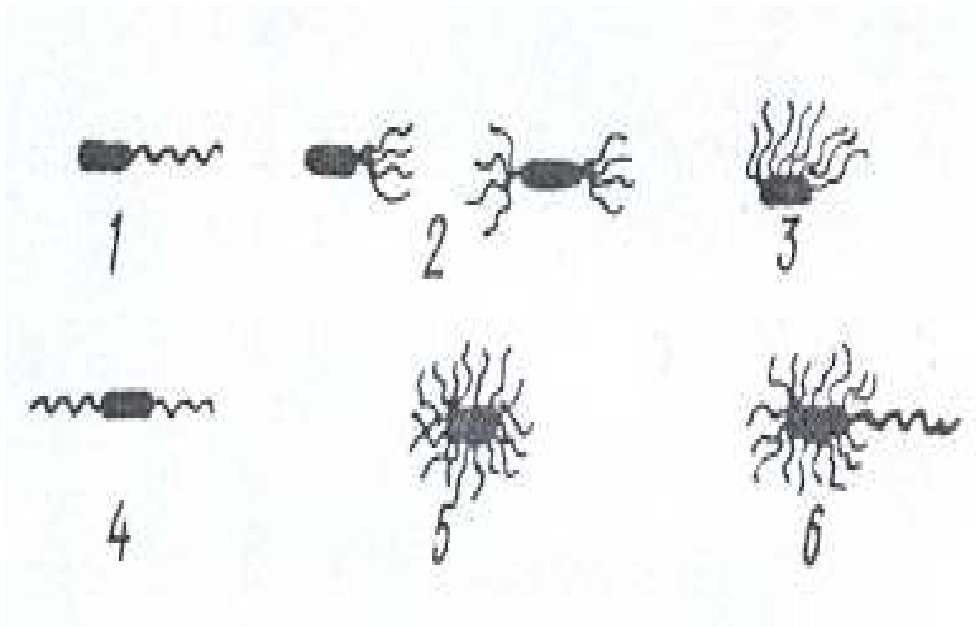


Рисунок 13. Типы жгутикования у бактерий: 1 – монотрихальное; 2 – лофотрихальное; 3 – латеральное; 4 – амфитрихальное; 5 – перитрихальное; 6 – «смешанное» полярно - перитрихальное

Жгутики берут начало под цитоплазматической мембраной и через поры мембраны и клеточной стенки выходят наружу. У разных бактерий длина жгутиков колеблется от 3 до 20 мкм, толщина - от 10 до 20 нм, а их число - от 1 до 100. Жгутики могут быть расположены монополярно, биполярно, вдоль боковой или по всей поверхности клетки (рис. 13). Клетки некоторых бактерий имеют одновременно два разных набора жгутиков: полярные и перитрихальные, различающиеся по длине и толщине.

Наличие, число, размеры и расположение жгутиков имеют диагностическое значение. Например, виды рода *Vibrio* снабжены одним полярным жгутиком, у *Selenomonas* один жгутик прикрепляется сбоку. Для представителей рода *Pseudomonas* характерно монотрихальное или лофотрихальное монополярное жгутикование, а для спирилл - лофотрихальное моно- и биполярное. Перитрихальное расположение жгутиков свойственно видам *Clostridium*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Caryophanon* и др. Нередко в пределах одного рода бактерий обнаруживаются подвижные и неподвижные виды, а у подвижных форм может быть разный тип жгутикования. Так, у подвижных представителей рода *Bacillus* жгутики расположены латерально или перитрихально.

Активное движение большинства бактерий, обладающих жгутиками, возможно только в жидкой среде. Однако некоторые бактерии - перитрихи могут передвигаться и по твердому субстрату. К ним относится, например, *Proteus vulgaris*, который довольно быстро распространяется по поверхности влажной агаризованной среды, образуя обширный тонкий налет. Движение жгутиконосных бактерий наблюдается преимущественно в молодых культурах. С возрастом клетки постепенно теряют жгутики и становятся неподвижными, хотя и сохраняют жизнеспособность.

К подвижным формам относятся спирохеты, миксобактерии, многие нитчатые цианобактерии и флексибактерии, не имеющие жгутиков. Они способны передвигаться по твердому или полутвердому субстрату путем скольжения. Спирохеты могут перемещаться и в жидкой среде вращательными, легкими волнообразными движениями. Скользящее движение обусловлено, возможно, неравномерным выделением слизи через поры клеточной стенки. Подвижность спирохет и некоторых миксобактерий (виды *Mucosoccus*) связывают также с сокращением аксиальных микрофибрилл, расположенных под клеточной стенкой (у спирохет) или под цитоплазматической мембраной (у миксобактерий).

К покоящимся формам бактерий относятся эндоспоры, цисты, акинеты. Они позволяют клетке более или менее длительное время переносить неблагоприятные условия. В условиях, подходящих для роста, покоящиеся формы развиваются в обычную вегетативную клетку.

Эндоспоры. Способностью образовывать эндоспоры обладают палочковидные бактерии, относящиеся к родам *Bacillus*, *Clostridium* и *Desulfotomaculum*, а также некоторые кокки (род *Sporosarcina*) и термофильные актиномицеты рода *Thermoactinomyces*. Спорообразование представляет собой сложный процесс дифференцировки, начинающийся в культуре, когда она переходит в стационарную фазу роста и когда создаются условия, индуцирующие его. Эти условия весьма разнообразны: дефицит питательных веществ в среде, накопление продуктов метаболизма, изменение кислотности среды, температуры и др. В результате внутри вегетативной клетки образуется новая клетка - эндоспора, полностью отличающаяся от материнской по

структуре, химическому составу и физиологическим свойствам. Эндоспоры одеты толстыми многослойными труднопроницаемыми покровами и имеют очень низкое содержание воды, поэтому при микроскопическом исследовании их легко узнать по высокой светопреломляющей способности.

Форма клеток многих бактерий в процессе спорообразования не меняется. Эндоспора локализуется в центре клетки, эксцентрично или (и) терминально, что зависит от вида бактерий. Это так называемый бациллярный тип спорообразования (рис. 14, 1). У ряда бактерий середина клетки при формировании споры несколько расширяется, и клетка приобретает вид челнока или веретена. Спора располагается в утолщенной части - в центре клетки или эксцентрично (рис. 14, 2). Это - клостридиальный тип спорообразования. У некоторых бактерий клетка при спорообразовании сильно расширяется и округляется на одном конце, становясь похожей на барабанную палочку. Спора локализуется в расширенном конце (рис. 14, 3). Такой тип спорообразования называется плектридиальным. Бациллярный тип спорообразования свойствен многим представителям рода *Bacillus*, клостридиальный и плектридиальный - в основном видам рода *Clostridium*. Нередко в культуре одного вида этого рода встречаются одновременно и клостридиальные и плектридиальные формы.

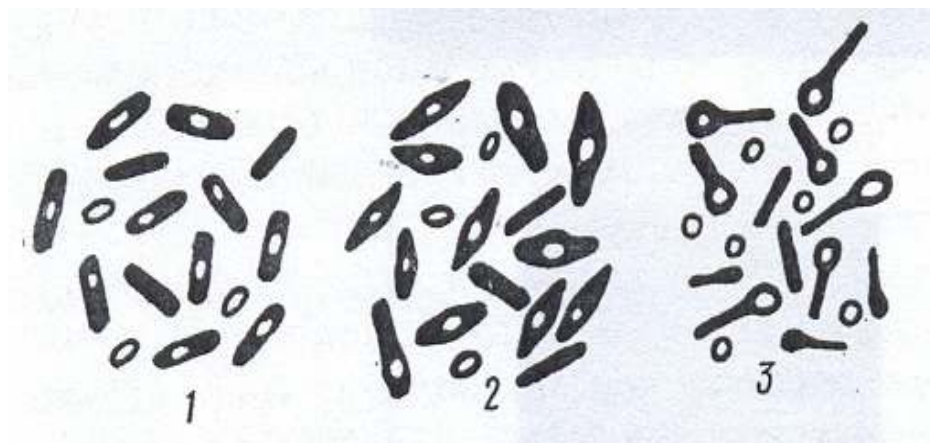


Рисунок 14. Типы образования эндоспор у бактерий: 1 – бациллярный; 2 – клостридиальный; 3 – плектридиальный

Эндоспоры бывают округлой, овальной или эллипсовидной формы. Их оболочка может быть гладкой или с выростами. Диаметр эндоспор ряда бактерий значительно превышает поперечник клетки. Тип спорообразования, а

также форма, размеры и расположение эндоспоры в вегетативной клетке используются для диагностики бактерий.

В каждой вегетативной клетке формируется, как правило, только одна эндоспора. После созревания эндоспоры освобождаются вследствие лизиса материнских клеток и переходят в стадию покоя. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к различным неблагоприятным факторам и могут сохранять жизнеспособность в течение многих лет, пока не попадут в условия, способствующие их прорастанию.

Спорообразование - не обязательная стадия развития бактерий. Можно создать такие условия, в которых клетки не будут переходить к формированию спор.

Цисты обнаруживаются у миксобактерий, риккетсий, представителей родов *Azotobacter*, *Bdellovibrio*, *Arthrobacter*. Их образование происходит обычно на поздних стадиях развития бактерий и связано с неблагоприятными условиями культивирования - истощением питательного субстрата, загрязнением среды вредными продуктами обмена, высушиванием и т. д. Цисты можно увидеть только в старых культурах.

Цисты бывают сферическими, овальными, неправильно округлыми или в виде сильно укороченных палочек. Чаще всего они крупнее вегетативных клеток. Иногда же по форме и размерам цисты почти не отличаются от них. У большинства бактерий цисты имеют утолщенную клеточную стенку и уплотненную цитоплазму, поэтому они сильнее преломляют свет, чем вегетативные клетки. Цисты устойчивее вегетативных клеток к неблагоприятным факторам, но уступают в этом эндоспорам.

Акинеты свойственны определенным видам нитчатых цианобактерий. Это крупные толстостенные клетки (рис. 15), возникающие либо из одной вегетативной клетки, либо путем слияния многих клеток. У некоторых цианобактерий акинеты обнаруживаются всегда и являются, вероятно, обязательной стадией развития, у других они образуются только в неблагоприятных условиях.

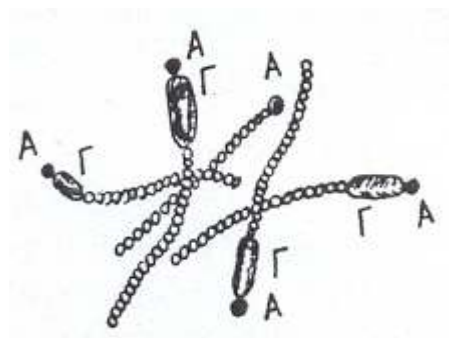


Рисунок 15. Акинеты (а) и гетероцисты (Г) нитчатой цианобактерии *Cylandrospermum*

Клетки всех бактерий, за исключением микоплазм, покрыты снаружи клеточной стенкой, толщина которой у разных видов колеблется в пределах 0,01-0,04 мкм. В соответствии с различиями в химическом составе клеточных стенок и их ультраструктуре, выражающимися в неодинаковой способности клеточных стенок удерживать красители трифенилметанового ряда с йодом, прокариотные микроорганизмы делятся на две группы. К одной относятся бактерии, в клетках которых комплекс, образуемый кристаллическим или генциановым фиолетовым и йодом, не обесцвечивается при последующей обработке спиртом. К другой группе принадлежат бактерии, не обладающие свойством удерживать краситель и обесцвечивающиеся при обработке спиртом. Этот способ дифференциальной окраски бактерий был предложен в 1884 году датским физиком Христианом Грамом. Бактерии, которые способны окрашиваться по Граму, называются грамположительными, а не способные окрашиваться - граммотрицательными. К первой группе относится большинство кокковых форм, спорообразующие палочковидные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, нитчатые бактерии *Cacyophanon*, ветвящиеся бактерии. Ко второй принадлежат различные палочковидные бактерии, не образующие эндоспор (роды *Pseudomonas*, *Escherichia* и др.), простекобактерии, миксобактерии, риккетсии, многие нитчатые формы, спирали, спирохеты, некоторые кокки и др. Химический состав и строение клеточных стенок граммотрицательных микроорганизмов значительно сложнее, чем грамположительных.

С особенностями химического состава клеточных стенок связывают и кислотоустойчивость микобактерий. Она выражается в способности клеток, фиксированных и окрашенных при подогревании карболовым фуксином,

прочно удерживать окраску после обработки раствором минеральной кислоты или подкисленным спиртом .

Определенными способами, например, под действием лизоцима, бактериальные клетки могут быть лишены клеточных стенок. В таком виде они способны существовать только в изотонической питательной среде.

Клеточная стенка многих бактерий снаружи может быть окружена слизистым слоем - капсулой. Капсулы бывают полисахаридной, иногда гликопротеидной или полипептидной природы. Капсулы толщиной менее 0,2 мкм, неразличимые в световом микроскопе, называют микрокапсулами. Капсула и клеточная стенка являются поверхностными структурами бактериальной клетки, к которым относят также жгутики и обнаруживаемые у многих подвижных и неподвижных бактерий ворсинки (фимбрии, пили). Ворсинки короче и тоньше большинства жгутиков – их длина 3-4 мкм, диаметр 4-35 нм. Число ворсинок у разных бактерий бывает от нескольких единиц до многих тысяч. К подвижности бактерий они, по-видимому, не имеют отношения. Капсулы и ворсинки не являются необходимыми клеточными структурами. Бактерии нормально функционируют и без них.

Обязательной структурой любой клетки является цитоплазматическая мембрана, которая отделяет цитоплазму от клеточной стенки. Толщина мембраны. 5-10 нм. При нарушении ее целостности клетки утрачивают жизнеспособность. Цитоплазма ряда бактерий пронизана мембранными структурами, которые являются производными цитоплазматической мембраны. У гетеротрофных бактерий их называют мезосомами. Они имеют вид пластинок (ламелл), пузырьков (везикул) или трубочек. Мезосомы могут быть расположены в зоне клеточного деления, вблизи нуклеотида и на периферии клетки, недалеко от цитоплазматической мембраны. У грамположительных бактерий мезосомальные структуры развиты в большей степени, чем у грамотрицательных. У фототрофных бактерий мембранные образования в виде пузырьков называют хроматофорами, а уплотненной формы - тилакоидами. Есть бактерии, у которых мембранная система не обнаруживается.

Определенную область в цитоплазме бактериальной клетки занимает нуклеоид. Он состоит из одной двойной спирально закрученной нити ДНК, замкнутой в кольцо. Ядерный аппарат прокариот не имеет ядрышка и не отделен от цитоплазмы мембраной. Через мезосомы нуклеоид связан с цитоплазматической мембраной. В период интенсивного деления в клетках ряда бактерий (*Escherichia coli*, *Oscillatoria amoena*) можно обнаружить несколько нуклеоидов.

В цитоплазме бактерий в свободном виде или в связи с мембранными структурами находятся рибосомы. Они имеют константу седиментации 70S, их размеры колеблются в пределах от 15 до 30 нм. Число рибосом может быть от 5 до 50 тыс., что зависит от возраста клетки и условий культивирования. Рибосом больше в молодых клетках.

В клетках различных бактерий часто обнаруживаются включения запасных веществ. Это полисахариды, липиды, полифосфаты, сера. Они накапливаются при избытке тех или иных питательных веществ в окружающей среде, а расходуются при голодании. Из резервных полисахаридов особенно распространены глюканы: гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество - гранулёза. Они выявляются в клетках спорообразующих бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*, а также у пурпурных бактерий и др. Полисахариды откладываются в цитоплазме равномерно или в виде гранул. Запасные липиды бактерий представлены полиэфиром β - оксимасляной кислоты и восками. Полиоксибутират накапливается на средах с избытком углерода у многих бактерий: видов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Azotobacter*, *Sphaerotilus* и др. Он обнаружен только у прокариот. Воска - эфиры высокомолекулярных жирных кислот и спиртов характерны для микобактерий. Полисахариды и липиды служат хорошим источником углерода и энергии для клетки.

В условиях, препятствующих синтезу нуклеиновых кислот, у многих бактерий создается резерв фосфора в виде гранул полифосфатов. Впервые они были описаны у *Spirillum volutans*, поэтому их называли волютином. Эти образования называют также метакрохроматиновыми зёрнами, так как они

проявляют метахроматический эффект: приобретают красную окраску при обработке синим красителем.

Отдельные виды спорообразующих бактерий (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus popilliae* и др.) в определенных условиях образуют в клетках кристаллы белковой природы, которые имеют правильную бипирамидальную форму и расположены непосредственно около споры. Их называют параспоральными тельцами.

Некоторые бактериальные структуры и включения, сильно преломляющие свет (эндоспоры, аэросомы, отложения полиоксибутирата и серы), хорошо заметны в световом микроскопе без специальной обработки. Часть структур (жгутики, клеточная стенка, нуклеоид, волютин и др.) можно выявить с помощью светооптического микроскопа только после окрашивания соответствующими красителями. Ряд структурных элементов бактерий - микрокапсулы, ворсинки, мезосомы, рибосомы и др. различимы только

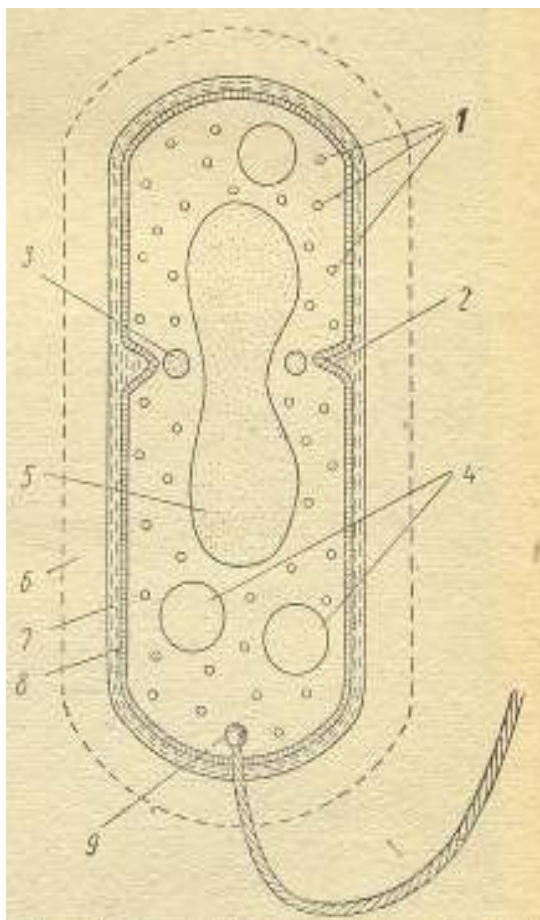


Рисунок 16. Схема строения бактериальной клетки: 1 – рибосомы, 2 – начавшееся образование поперечной перегородки, 3 и 4 – запасные отложения, 5 – ядерный район, 6 – капсула, 7 – стенки клетки, 8 – протоплазматическая мембрана, 9 – зерно, от которого начинается жгутик

в электронном микроскопе (рис.16).

ДРОЖЖИ

В группу дрожжей объединяются грибные организмы, которые в ростовой фазе существуют преимущественно в виде отдельных клеток. Примерно 2/3 дрожжей относится к классу сумчатых грибов (*Ascomycetes*). Дрожжи есть также в классе базидиомицетов (*Basidiomycetes*) и дейтеромицетов - несовершенных грибов (*Deuteromycetes - Fungi imperfecti*).

Клетки разных видов дрожжей морфологически весьма разнообразны. Они бывают круглые, овальные, цилиндрические, яйцевидные, лимоновидные, колбовидные, треугольные, стреловидные и серповидные. Дрожжевые клетки значительно крупнее бактериальных. Длина их варьирует у разных видов от 2 до 20, иногда до 50 мкм, ширина от 1,5 до 10 мкм. К числу наиболее крупных дрожжей относятся, например, представители родов *Saccharomyces* и *Lipomyces*, наиболее мелкими являются виды *Pichia* и *Hansenula*.

Как уже отмечалось, дрожжи существуют в основном в одноклеточной форме. Однако в культурах многих видов наблюдаются скопления разных размеров и очертаний, а некоторые дрожжи на определенной стадии развития могут образовывать мицелиальные структуры (рис. 17). Дрожжи являются неподвижными организмами.

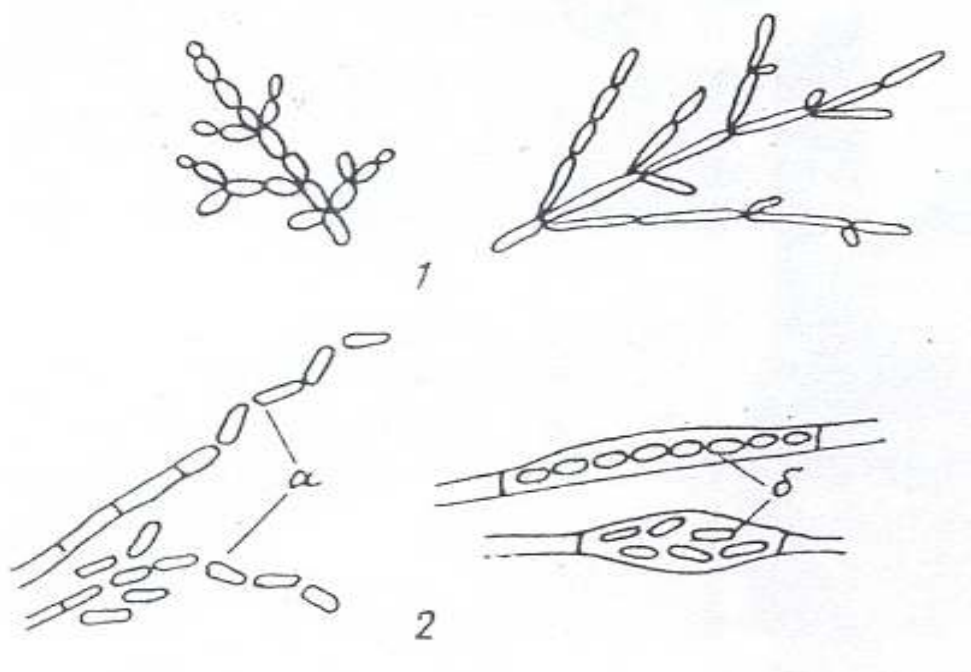


Рисунок 17. Мицелиальные формы дрожжей: 1 – псевдомицелий; 2 – истинный мицелий; а – артроспоры; б – эндоспоры

Дрожжи размножаются разными способами: вегетативно, бесполоыми спорами и половым путем. Наиболее распространенным способом вегетативного размножения является почкование (рис. 18, 1). К почкующимся дрожжам относятся, например, виды родов *Saccharomyces* и *Lipomyces*. Если при почковании вновь возникающие клетки не отделяются друг от друга, то образуется псевдомицелий. Он отличается тем, что в зоне перегородок между клетками имеются перетяжки (рис. 18, 1). Образование псевдомицелия особенно характерно для дрожжей рода *Candida*.

Размножение делением (рис. 18, 2) встречается реже. Оно свойственно, например, видам *Schizosaccharomyces*. Когда не расходятся делящиеся клетки, формируется истинный мицелий. Между клетками истинного мицелия четко различается перегородка, но нет перетяжек (рис. 18, 2). У ряда дрожжей (определенные виды *Saccharomyces*, виды *Nadsonia* и др.) наблюдается так называемое почкующееся деление, при котором почка формируется на широком основании (рис. 18, 3). Почкующееся деление имеет морфологическое сходство с почкованием и делением.

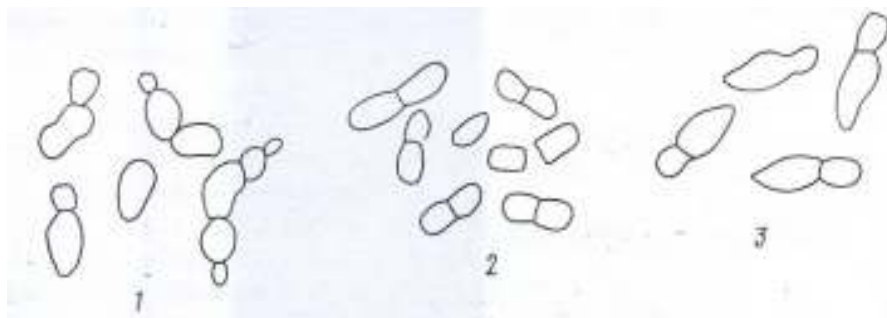


Рисунок 18. Способы вегетативного размножения дрожжей: 1 – почкование; 2 – деление; 3 – почкующееся деление

Бесполое и половое размножение связано с формированием специализированных репродуктивных структур. При половом размножении их появлению предшествует слияние клеток и последующее объединение ядер, при бесполом размножении предварительное слияние клеток и ядер не происходит.

Размножение бесполоыми спорами - баллистоспорами - характерно для видов *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* и др. Баллистоспоры возникают на заостренных выростах клеток - стеригмах (рис. 19). При созревании они с силой отбрасываются на некоторое расстояние. Баллистоспоровые дрожжи относятся к базидиомицетам. Истинный мицелий таких дрожжей может распадаться на

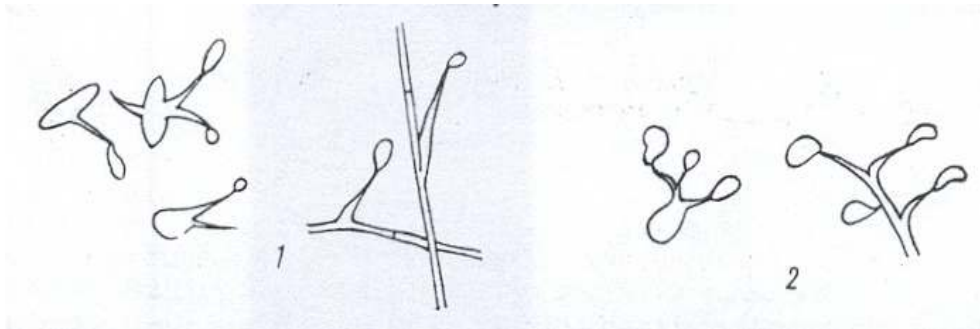


Рисунок 19. Баллистоспоры на отдельных клетках и гифах мицелия: 1 – *Sporobolomyces*; 2 - *Sporidiobolus*

отдельные клетки, называемые артроспорами.

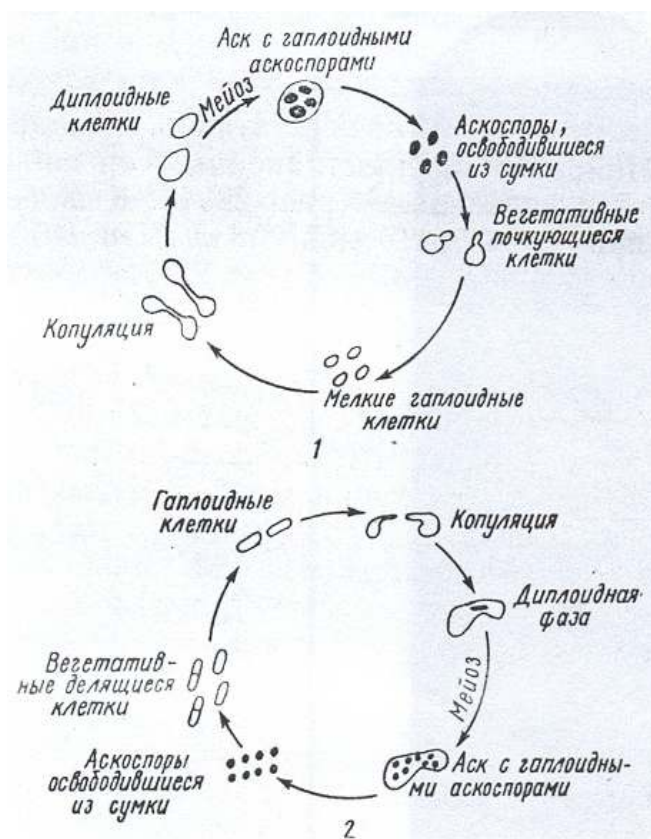


Рисунок 20. Жизненные циклы некоторых дрожжей: 1 – *Saccharomyces cerevisiae*; 2 – *Schizosaccharomyces (Octosporomyces) octosporus*

Половое размножение большинства дрожжей (аскомицетов) связано с образованием асков (сумок) и аскоспор. у одних (виды *Saccharomyces*, *Debaryomyces* и др.) образование асков происходит сразу после изо- или гетеро-

гамной копуляции почек или вегетативных гаплоидных клеток в диплоидную. У других (виды *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes* и др.). Аски формируются из ранее возникших диплоидных клеток партеногенетически, т. е. без непосредственно предшествующей копуляции. В асках в результате мейоза образуются гаплоидные аскоспоры. В каждом аске бывает, как правило, от 2 до 8 спор. Иногда (виды *Lipomyces*) их число достигает нескольких десятков. Аскоспоры многих дрожжей (виды *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*) освобождаются из сумок и превращаются в вегетативные клетки (рис.20).

У базидиомицетов в результате полового процесса развиваются специализированные репродуктивные клетки - базидии, на которых образуются экзогенные споры (базидиоспоры).

Обычно половой процесс чередуется у дрожжей с вегетативным размножением. Однако длительность гаплоидной и диплоидной фаз у разных дрожжей неодинакова. Например, у *Saccharomyces cerevisiae* преобладает диплоидное состояние, у *Schizosaccharomyces (Octosporomyces) pombe* - гаплоидное. Кроме того, половой процесс и образование аскоспор у дрожжей происходит только в определенных условиях. В культурах *Saccharomyces* активное спорообразование можно наблюдать, если молодые активные клетки, выращенные на полноценной богатой среде, поместить в условия недостаточного питания, плохого снабжения кислородом и влагой..

К половому процессу способны многие дрожжи. Но есть и такие, у которых половой процесс и спорообразование не обнаружены. Их включают в класс несовершенных грибов. К ним относятся представители *Candida*, *Torulopsis* и *Cryptococcus*.

Споры дрожжей отличаются значительной, хотя и меньшей, чем эндоспоры бактерий, устойчивостью к неблагоприятным воздействиям. Они имеют утолщенную клеточную стенку, поэтому под микроскопом заметно выделяются как структуры, сильно преломляющие свет.

Покоящимися формами дрожжей являются так называемые хламидоспоры - толстостенные округлые клетки, образовавшиеся из вегетативных и заполненные резервными веществами, главным образом липидами. Они

обнаруживаются у определенных дрожжей либо в связи с мицелиальными структурами (патогенные виды *Candida*), либо в форме отдельных клеток (у *Lipomyces* и *Cryptococcus*; рис. 21). При пересеве в свежую питательную среду хламидоспоры *Lipomyces* и *Cryptococcus* начинают активно почковаться, сбрасывая наружные слои клеточных стенок.

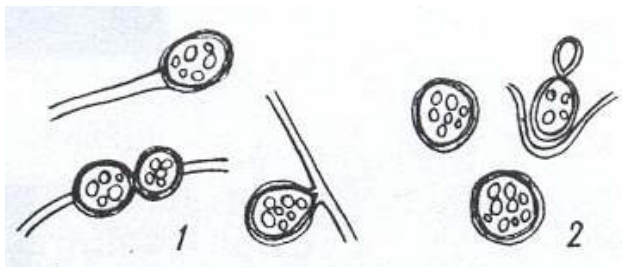


Рисунок 21. Хламидоспоры дрожжей: 1 – на гифах мицелия; 2 – без мицелия.
В хламидоспорах видны капли жира

Дрожжи имеют достаточно сложную структурную организацию, типичную для эукариотных организмов. Клеточная стенка дрожжей, в отличие от бактериальной, легко различима в световом микроскопе. Как и у большинства бактерий, она ригидна и обуславливает постоянство формы клеток. Клетки ряда дрожжей в определенных условиях могут быть окружены слизистой капсулой полисахаридной природы. Толщина капсул сильно варьирует. Иногда капсульный слой различим только с помощью электронного микроскопа, а в ряде случаев он заметно превышает диаметр клетки.

К клеточной стенке изнутри примыкает цитоплазматическая мембрана. В цитоплазме обнаруживается ядро. Оно ограничено от цитоплазмы двуслойной мембраной с порами. Внутри ядра имеется ядрышко. В клетках мицелиальной формы базидиомицетовых дрожжей содержится два ядра. На поверхности наружной ядерной мембраны локализованы рибосомы.

Постоянными компонентами дрожжевой клетки являются митохондрии. Они имеют вид гранулярных, нитевидных или ветвистых структур. Количество митохондрий в клетке достигает сотен и даже тысяч единиц. Их средние размеры лежат в пределах видимости светооптического микроскопа (около 0,4 мкм). Митохондрии лучше развиты у дышащих дрожжей. Как и у всех эукариот, у дрожжей хорошо развит мембранный аппарат. Он представлен эндоплазматической сетью, аппаратом Гольджи и лизосомами. В старых

культурах дрожжей четко видны вакуоли, окружённые мембраной. В почках и молодых клетках они, как правило, не обнаруживаются.

В клетках дрожжей, выращенных при определенных условиях, легко выявляются включения запасных веществ. При культивировании на средах с избытком сахара в цитоплазме часто накапливается гликоген. Он имеет вид зерен, глыбок или крупных конгломератов. Скопления зерен гликогена могут придавать клеткам дрожжей гранулярную структуру. К характерным включениям дрожжей относятся липиды. Их бывает особенно много у видов *Lipomyces*, *Candida* и *Trichosporon*. В клетках *Candida* и *Trichosporon* липиды видны как отдельные включения, а у *Lipomyces* они могут маскировать все другие внутренние структуры, так что клетки выглядят как капли жира, окруженные оболочкой. В вакуолях часто обнаруживаются полифосфатные гранулы - волютин.

Наибольшее практическое применение в пищевой промышленности находят дрожжи рода *Saccharomyces*, который включает около 40 видов, которые обладают способностью превращать сахара в спирт. Мейен в 1837 году различал в соответствии с их источником три вида дрожжей. Выделенных из спиртных напитков: *Saccharomyces vini* – из вина, *Saccharomyces cerevisiae* – из пива и *Saccharomyces pomorum* – из сидра. Штаммы, отнесенные к *Saccharomyces cerevisiae*, получили широкое распространение в пивоварении, производстве спирта, приготовлении вина, а также в получении пекарских дрожжей и биомассы. Все штаммы, классифицированные, как *Saccharomyces cerevisiae*, способны в аэробных условиях расти на лактозе, мальтозе и трегалозе, но не могут расти на лактозе и целлобиозе. В анаэробных условиях дрожжи сбраживают гексозы и дисахара после их гидролиза, пентозы - не сбраживают. Во многих промышленных процессах дрожжи растут в среде, обогащенной сахарами. В этих условиях рост происходит анаэробно и потребляемый сахар превращается в углекислый газ и этанол.; процесс этот известен, как спиртовое брожение. Даже при энергичной аэрации дрожжи продолжают перерабатывать сахар в углекислый газ и этанол до тех пор, пока концентрация сахаров не упадет до очень низкого уровня. Высокий уровень легко усваиваемых сахаров подавляет способность клеток осуществлять

аэробное дыхание, даже когда нет недостатка в кислороде. Это явление известно как катаболитная регрессия.

В анаэробных условиях образующийся этанол не подвергается дальнейшим превращениям, тогда как в аэробных условиях дрожжевые клетки после истощения запаса сахара начинают утилизировать накопленный ими этанол, переводя его в углекислый газ и воду.

Saccharomyces cerevisiae может расти в условиях брожения с очень высокой скоростью (время удвоения примерно 1,6 ч), однако конечный выход клеток оказывается незначительным. В условиях, благоприятствующих аэробному метаболизму, рост дрожжей протекает с такой же скоростью, но достигает гораздо большего выхода клеток. Тот факт, что при данном содержании сахара в аэробных условиях получается больше дрожжевых клеток, чем в анаэробных впервые был замечен Пастером, и поэтому это явление носит название эффект Пастера.

При выращивании дрожжей в анаэробных условиях они превращают глюкозу в пируват посредством метаболического пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (ЭМП). Однако накапливающийся пируват не может принять участие в цикле трикарбоновых кислот и НАДН₂, накопившийся в ходе гликолиза, не окисляется цитохромной системой. В этих условиях пируват декарбоксилируется другим ферментом до ацетальдегида, который восстанавливается в этанол с помощью НАДН₂, накопившегося в ходе гликолиза. В ходе превращения глюкозы в этанол путем брожения образуется только 4 молекулы АТФ, так что брожение – это менее эффективный процесс, чем аэробное дыхание. Количество АТФ, требуемое для биосинтеза, одинаково вне зависимости от того, растут ли клетки в аэробных или анаэробных условиях, поэтому при анаэробном метаболизме для производства такого же количества клеточного материала дрожжам необходимо утилизировать гораздо больше глюкозы. В этом состоит биохимическое объяснение эффекта Пастера.

Как уже указывалось, спиртовое брожение происходит не только в анаэробных условиях. Дрожжевые клетки, растущие в аэробных условиях при высоком уровне глюкозы в среде, также сбраживают глюкозу в этанол. Подавление аэробного дыхания высоким содержанием глюкозы, или, точнее,

высокой скоростью усвоения глюкозы называется эффектом Крэбтри или кatabолической регрессией.

Когда вся глюкоза переведена в спирт, кatabолитная регрессия снимается и клетки могут продолжать рост путем аэробного усвоения этанола, накопившегося на стадии брожения.

Регуляция метаболизма дрожжей – очень сложный процесс. Рост клеток может протекать аэробным и анаэробным путем, в условиях кatabолитной репрессии и в нерепрессированном состоянии. Каждый из этих вариантов характеризуется различными уровнями функционирования пути ЭМП, пентозофосфатного пути, цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла. Скорость гликолиза меняется в зависимости от доступности для клетки субстратов или кофакторов, таких как НАД и АДФ.

МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ

в группу мицелиальных грибов, изучаемых микробиологами, объединяются определенные представители трех классов: *Zygomycetes*, *Ascomycetes* и *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*).

Клетки мицелиальных грибов имеют вытянутую форму и образуют систему ветвящихся нитей (гиф), называемую мицелием. Диаметр гиф вегетативного мицелия многих мицелиальных грибов больше поперечника бактериальной клетки: он варьирует от 5 до 30 мкм и даже более. Гифы часто хорошо видны невооруженным глазом. Мицелий большинства зигомицетов несептированный (ценоцитный) и представляет собой одну гигантскую клетку. Некоторое количество перегородок появляется в мицелии этих грибов при образовании органов плодоношения, а также при старении и в неблагоприятных условиях. Аскомицеты и несовершенные грибы имеют расчлененный, многоклеточный мицелий.

Некоторые грибы на определенной стадии развития образуют тела плотной консистенции, состоящие из переплетений сильно разветвленных гиф - склероции. У одних видов они твердые, у других мягкие и сочные. Склероции обычно служат для перенесения неблагоприятных условий и рассматриваются как покоящиеся формы грибов. Их можно обнаружить, например, в колониях

некоторых видов *Aspergillus* и *Penicillium*. Мицелиальные грибы - неподвижные организмы.

Мицелиальные грибы размножаются вегетативным, бесполом и половым путем. Вегетативное размножение осуществляется отдельными участками мицелия, то есть без образования специализированных органов размножения. Бесполое размножение зигомицетов происходит с помощью эндоспор, образующихся в специальных крупных шаровидных клетках - спорангиях. Последние формируются на свободных концах плодоносящих гиф - спорангиеносцах (спорангиофорах), которые могут иметь разнообразную форму: грушевидную (*Mucor*), шаровидную (*Rhizopus*), булабовидную (*Actinomicor*) и др. (рис. 22). У мицелиальных аскомицетов бесполое размножение осуществляется экзоспорами (конидиями), образующимися на конидиеносцах (конидиофорах), форма которых бывает разной. Так, конидиеносцы видов *Penicillium* двукратно ветвятся, а у видов *Aspergillus* на концах вздуты в форме головки (рис. 23). У несовершенных грибов бесполое конидии образуются на изолированных или расположенных группами конидиеносцах или в специальных структурах, названных пикнидами .

Половой процесс известен только у зигомицетов и аскомицетов. При половом размножении зигомицетов между гифами одного мицелия (у гомоталлических видов) или разных мицелиев (у гетероталлических) образуются короткие поперечные выросты, отделяющие на концах многоядерные клетки, носящие название гаметангиев. Они сливаются и образуют зиготу (зигоспору). После периода покоя зигота прорастает в спорангий. При этом имеет место мейоз. Многоядерная цитоплазма спорангия распадается на множество спорангиоспор, каждая из которых, освободившись при разрыве спорангия, в соответствующих условиях может прорасти в мицелий.

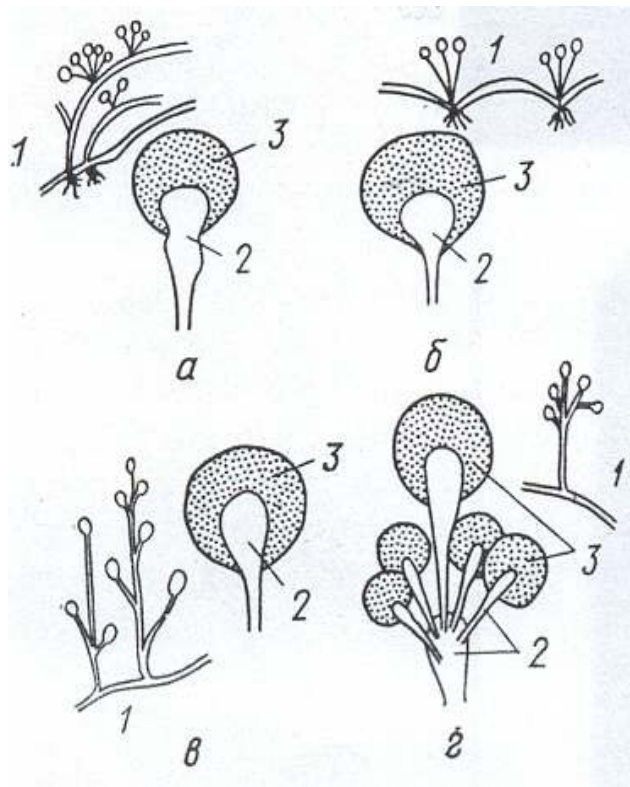


Рисунок 22. Спорангии и спорагиеносцы некоторых зигомикетов: *Absidia* (а); *Rhizopus* (б); *Mucor* (в); *Actinomucor* (г): 1 – плодоносящий мицелий, 2 – спорагиеносцы, 3 – спорангий со спорами

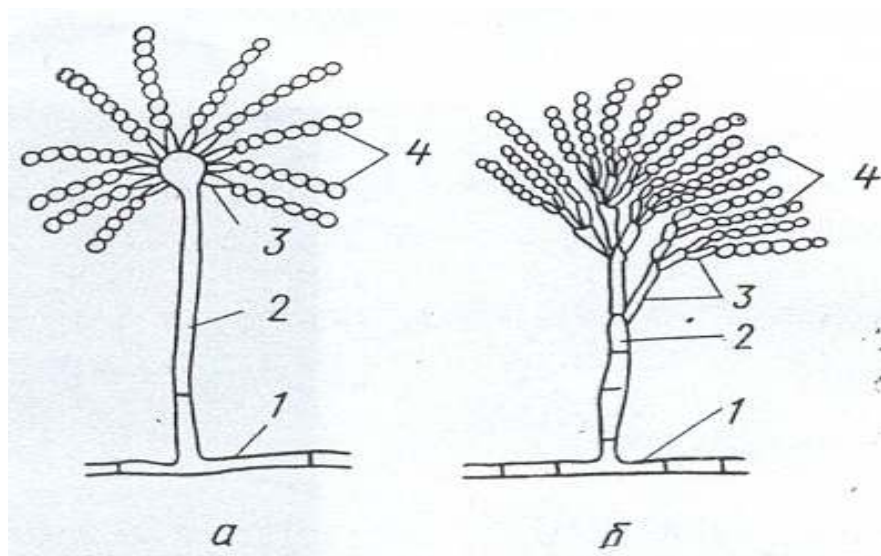


Рисунок 23. Конидиеносы у грибов рода *Aspergellius* (а) и *Pennicillium* (б); 1 – вегетативный мицелий, 2 – конидиофор, 3 – стеригмы, 4 - конидии

Большая часть жизненного цикла зигомикетов протекает в гаплоидной фазе.

У аскомикетов в результате полового процесса, которому предшествует плазмोगамия, кариогамия и мейоз, формируются специализированные клетки округлой, цилиндрической или булавовидной формы аски (сумки). В сумке образуется определенное число (чаще всего 8) аскоспор, с помощью которых и происходит размножение. У одних аскомикетов сумки

возникают непосредственно на мицелии, у других внутри или на поверхности плодовых тел, образуемых в результате сплетения гиф мицелия. Плодовые тела разных представителей могут различаться по форме и строению. У аспергиллов и пенициллов они замкнутые, чаще всего округлой формы. Их можно обнаружить в культуре гриба невооруженным глазом. У большинства аскомицетов плазмогамия и кариогамия при половом процессе разделены во времени.

У многих сумчатых грибов половому процессу предшествует формирование специализированных мужских и женских половых органов антеридия и архикарпа. В этом случае зигота возникает при слиянии половых клеток. Есть аскомицеты, у которых в зиготу сливаются два сходных гаметангия. У некоторых аскомицетов происходит объединение соматических гиф двух совместимых мицелиев. Среди сумчатых грибов есть гомоталлические и гетероталлические виды.

Клетки грибов имеют строение, характерное для клеток других эукариотных организмов (рис. 24). Как правило, у грибов хорошо выражена клеточная стенка. Она ригидна и у ряда представителей снаружи может быть покрыта слизистым слоем. Внутри от клеточной стенки расположена цитоплазматическая мембрана. Ядро у грибов, как и у всех эукариот, содержит ядрышко, хромосомы и окружено двуслойной мембраной с порами. При митотическом делении ядра целостность ядерной оболочки не нарушается. Размеры ядер в вегетативных гифах лежат на пределе видимости светового микроскопа. У ряда грибов ядра аморфны и вытянуты. Ценоцитный мицелий, не имеющий септ, многоядерный. Отдельные клетки септированного, многоклеточного мицелия могут содержать одно или несколько ядер. Последнее связано в основном с тем, что образование перегородок между клетками значительно отстает от деления ядер. Кроме того, возможна миграция ядер через нестроенные септы из одной клетки в другую. Рибосомы у грибов рассеяны в цитоплазме, а не локализованы на поверхности мембран, как у других эукариот.

Система внутренних мембран у грибов развита хорошо. Все грибы имеют митохондрии, которые сходны с митохондриями высших организмов, но у

грибов "они мельче, чем у высших растений, и имеют иное строение крист. Мембранные структуры грибов представлены также эндоплазматической сетью, аппаратом Гольджи и лизосомами.

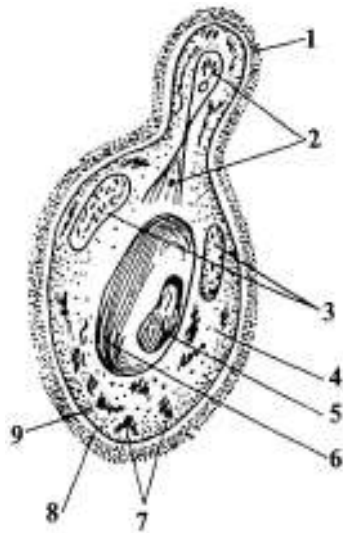


Рисунок 24. Схема строения дрожжевой клетки:

1-клеточная стенка, 2-делящееся ядро, 3-зерна гликогена, 4-цитоплазма, 5-метахроматин, 6-вакуоль, 7-митохондрии, 8-клеточная мембрана, 9-рибосомы.

Характерными мембранными образованиями грибной клетки являются ломасомы. Они возникают между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной в результате отслоения мембраны от стенки. Ломасомы имеют вид пузырьков и обнаруживаются около клеточной стенки. В клетке грибов хорошо видны вакуоли. Обычно они локализуются вблизи клеточной стенки и число их увеличивается в старых культурах.

Основные запасные питательные вещества грибов - волютин, липиды и гликоген. Их можно обнаружить как в цитоплазме, так и в вакуолях. Чаще всего они локализуются в виде гранул. Липиды бывают представлены также жировыми каплями, а волютин в виде коллоидного раствора (в вакуолях). Кроме того, в гифах можно обнаружить кристаллы кальция, а также кристаллы, природа которых пока не установлена.

ГЛАВА 2

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

Микробиологи имеют дело с популяциями (культурами) микроорганизмов, состоящими из миллионов особей. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют чистой. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название смешанной. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Ввиду того что в воздухе и на поверхности предметов (на столах, инструментах, одежде), а также на руках, волосах и т. д. всегда имеется большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Требование чистоты культур в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.

Кроме основного рабочего помещения лаборатория имеет стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, бокс, моечную, холодильную комнату, помещение для хранения культур и т. д.

Бокс служит для пересевов микроорганизмов и представляет собой небольшую изолированную комнату, разделенную перегородкой на две части. Вход в рабочее помещение бокса осуществляется через тамбур с раздвижной дверью, что исключает резкое перемещение воздуха и, следовательно, занесение извне посторонней микрофлоры. Оборудование бокса состоит из стола, стула, газовой горелки и бактерицидной лампы, укрепленной в специальном штативе или смонтированной на потолке бокса. Удобно иметь в боксе подсобный стол, на котором размещают необходимые во время работы предметы.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70%-ные (по объему) растворы изопропилового или этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных

форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. Поверхность рабочего стола можно дезинфицировать и ультрафиолетовыми лучами. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

В лаборатории не разрешается курить, есть, пить. Работать следует в халатах.

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и в жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри (рис. 25). Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Способы приготовления питательных сред и стерилизации подробно описаны в следующей главе пособия.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом, или инокуляцией. Посев микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Перед посевом следует тщательно надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают чернилами по стеклу или на специально наклеенной этикетке.

Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей или иглой (рис. 26), если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, когда нужно приготовить препарат или пересеять культуры микроорганизмов, выросшие в жидкой питательной среде, лучше пользоваться не петлей, а стерильной пипеткой. Бактериологические петли и иглы делают, используя тонкую проволоку из платины или нихрома, которую закрепляют в металлическом держателе или впаивают в стеклянную палочку. Диаметр бактериологической петли – 4 – 5 мм.

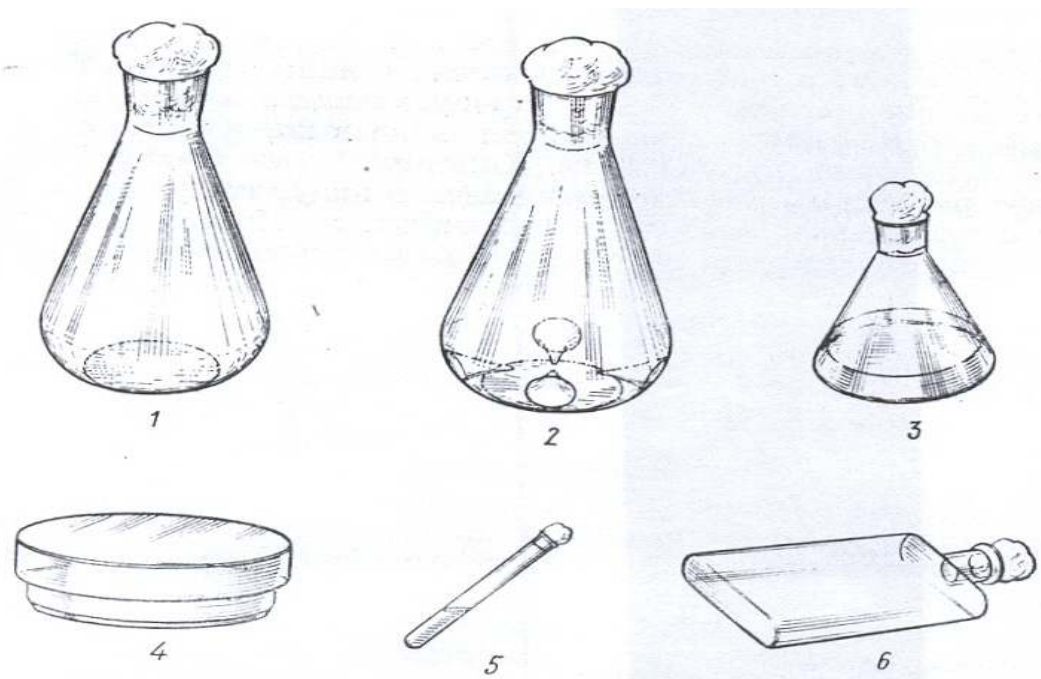


Рисунок 25. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1 – качалочная колба; 2 – качалочная колба с отбойниками; 3 – коническая колба; 4 – чашка Петри; 5 – пробирка; 6 – матрац



Рисунок 26. Бактериологическая петля (1) и бактериологическая игла (2)

Бактериологическую петлю (иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю

рекомендуется держать в пламени горелки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно раскалена на всем протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (рис. 27), поэтому не следует опускать петлю непосредственно к горелке. Сразу же после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю (иглу) вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

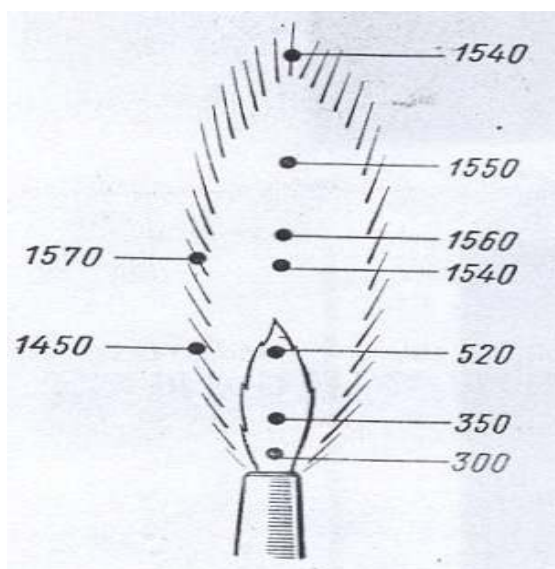


Рисунок 27. Значение температуры (в градусах Цельсия) в разных участках пламени газовой горелки

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом (рис. 28). Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю так, как держат карандаш, и прокалывают ее в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время последующих манипуляций. Края открытой пробирки с культурой микроорганизмов обжигают в пламени горелки и после этого вводят в пробирку

стерильную петлю. Взяв небольшое количество микробной массы с поверхности субстрата, вынимают петлю из пробирки, следя за тем, чтобы переносимый материал не касался стенок или краев пробирки.

Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают ватную пробку и закрывают ею пробирку. Если конец ватной пробки загорится, то не следует бросать пробку. Ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет. Ни в коем случае нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это только усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует снова вставлять ее в пробирку. Нужно взять новую стерильную пробку и начать всю операцию заново. Закрытую ватной пробкой пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата или для пересева культуры в свежую среду.

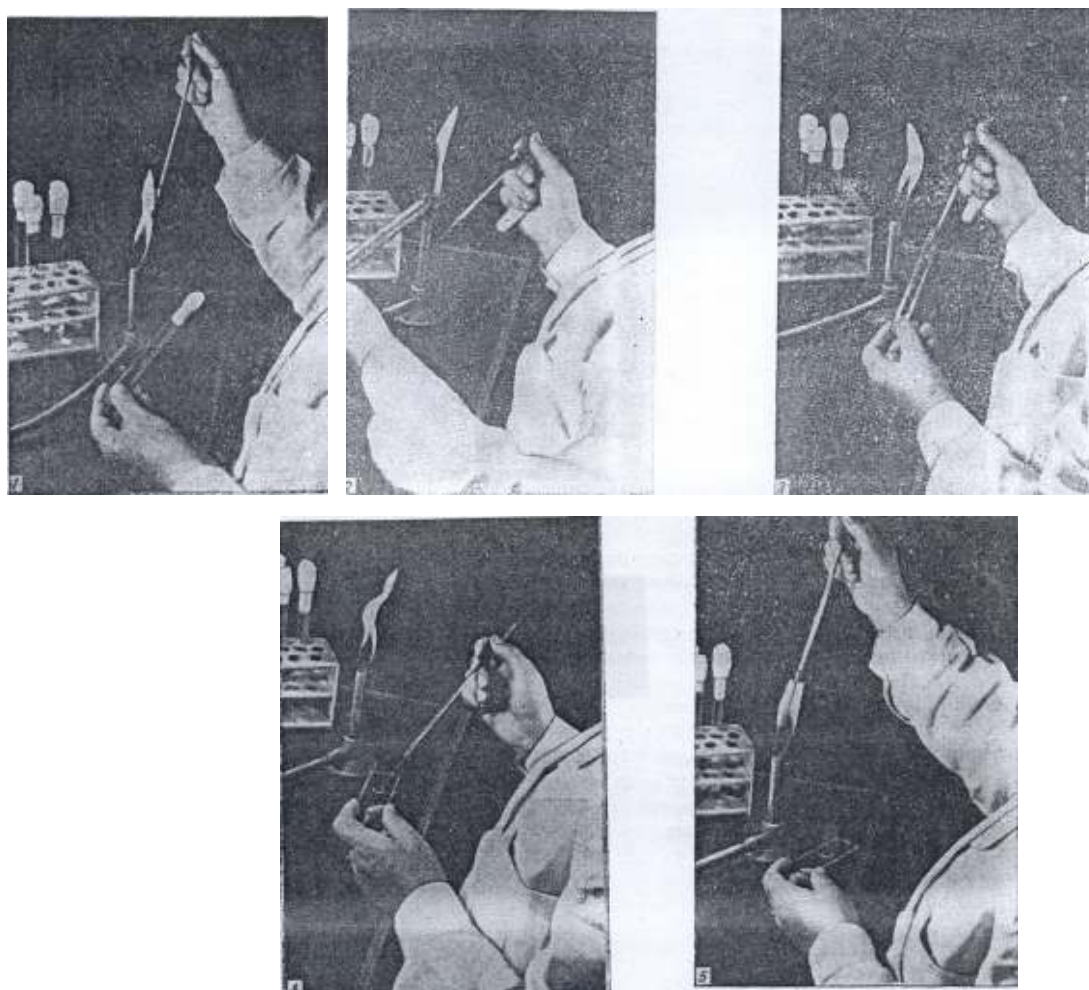


Рисунок 28. Способ стерильного извлечения микроорганизмов с поверхности плотной среды

Если культуру пересевают на скошенную агаризованную среду, то петлю вводят в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, проводят

снизу вверх либо зигзагообразную, либо прямую черту - штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды. В случае пересева в жидкую среду (в колбы или пробирки) петлю с микробной массой погружают непосредственно в среду. Оставшиеся на петле после пересева или приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени горелки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

Из жидкой среды клетки берут следующим образом: пипетку за верхний конец вынимают из бумаги или пенала, в которых она стерилизовалась, и вводят в пробирку или колбу с культурой, соблюдая все предосторожности, описанные выше (рис. 29). Отбирать жидкую культуру пипеткой можно с помощью резиновой груши. Использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 3-5% -ный водный раствор фенола или 2% -ный раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

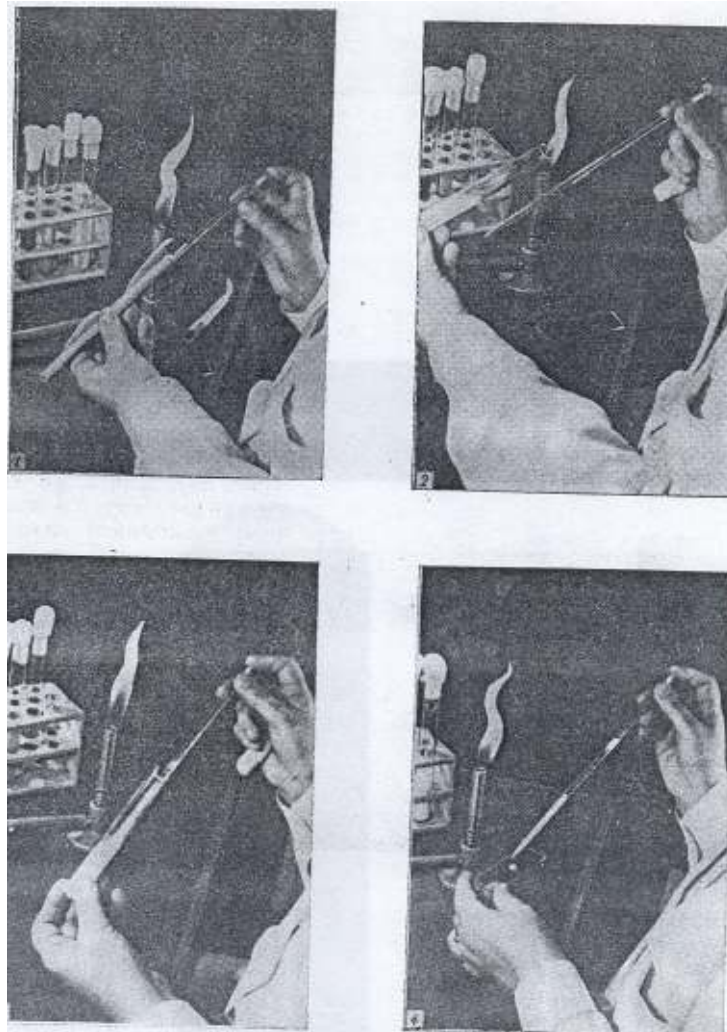


Рисунок 29. Способ стерильного извлечения микроорганизмов из жидкой среды

Когда необходимо провести рассев микроорганизмов из жидкой питательной среды на поверхность плотной среды в чашке Петри, поступают следующим образом. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри (рис. 30).

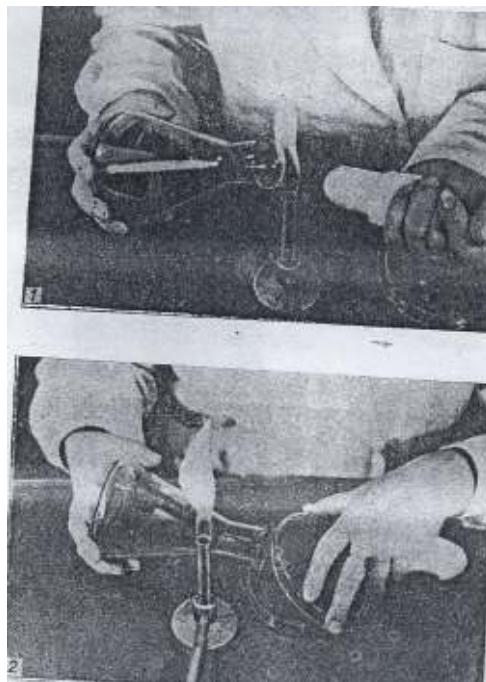


Рисунок 30. Разлив стерильной среды в чашки Петри

Для этого сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки. Затем обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большими средним пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (10-15 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды наносят каплю или «петлю» жидкой культуры, которую осторожно распределяют стеклянным стерильным шпателем (шпатель Дригальского) либо петлей.

Все описанные манипуляции следует проводить около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. После пересева пробирку или другие сосуды, в которых выращивают микроорганизмы, помещают в термостаты, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

Ведение лабораторных записей

Тетрадь для оформления лабораторных работ является документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных. В ней должны быть записаны сведения, имеющие отношение к выполнению данной работы. Запись необходимо вести аккуратно, четко и в определенном порядке, например:

1. Название опыта, дата его постановки и окончания.
2. Объект исследования.
3. Условия проведения опыта.
4. Основной принцип используемого метода анализа.
5. Полученные результаты.

Цифровой материал приводят в таблицах. Если необходимо, делают графики, диаграммы, рисунки. Каждая лабораторная работа должна заканчиваться собственными наблюдениями, рисунками и выводами, записанными в журнале.

ГЛАВА 3 СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание. В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни, как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов, микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение.

Различают термическую и холодную стерилизацию. В микробиологии находят применение следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим

воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение, из методов холодной стерилизации микробиологи используют стерилизацию фильтрованием, ультрафиолетовыми лучами и газообразными средствами. Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются в первую очередь физико – химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД:

- Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование)

Это наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации питательных сред. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Известно, что температура пара возрастает при повышении его давления (табл. 1).

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает особую эффективность данного способа. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121°. Лишь споры некоторых почвенных микробов погибают при 1 атм только через 20 мин. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – автоклавах.

Устройство автоклавов. Автоклавы разнообразны по форме, размерам, рабочему давлению, конструкции и другим показателям; они могут быть с ручным управлением, полуавтоматические, автоматические (рис. 31 и 32). Но поскольку все автоклавы предназначены для выполнения одной и той же задачи – стерилизации, основной принцип их устройства один и тот же. Разберём его на примере вертикального автоклава с ручным управлением (рис. 33).

Автоклав представляет собой металлический двустенный резервуар, способный выдерживать высокое давление. Его внутренняя часть является стерилизационной камерой (1). В нее помещают стерилизуемый материал. Стерилизационная камера снабжена краном (2) для выхода воздуха, манометром (3) для определения давления пара и предохранительным клапаном

(4) для выхода пара при повышении давления сверх необходимого и для предотвращения разрыва автоклава. Пространство между стенками (5), называемое водопаровой камерой, заполняется через воронку (6) водой (лучше дистиллированной, чтобы не образовывалась накипь) до определенного уровня, который отмечен на специальной водомерной трубке автоклава (7). Выше этого уровня воду наливать не следует, так как при бурном кипении вода может попасть в трубку, ведущую к манометру, и исказить его показания. В верхней части внутренней стенки водопаровой камеры имеются отверстия (8), через которые пар поступает в стерилизационную камеру. Паровой котёл сверху покрыт защитным кожухом (9). Он предохраняет котёл от механических повреждений, а работающих около автоклава - от ожогов. Для создания герметичности автоклав плотно закрывается массивной крышкой (10) с резиновой прокладкой.

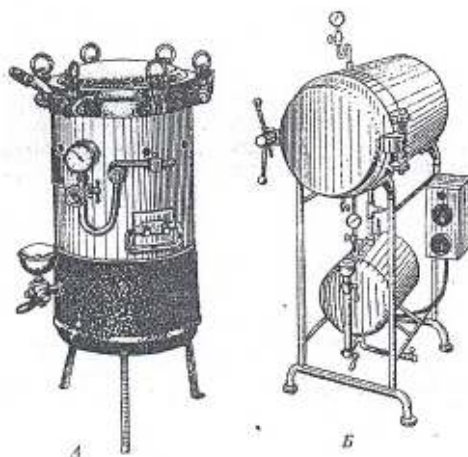


Рисунок 31 .Автоклавы цилиндрические: А – вертикальный с ручным управлением газовый; Б – горизонтальный, полуавтоматический, с электрическим обогревом

Таблица 1 - Температура насыщенного пара при различном давлении

Давление		Темпера- тура, °С
нормаль- ное, атм	добавочное, ати	
1,0	—	110
1,0	0,5	111
1,0	0,75	116
1,0	1,0	121
1,0	1,5	126
1,0	2,0	134
1,0	2,5	138

Автоклавирование. Отдельные операции процесса стерилизации в автоклавах разных типов могут быть несколько различными. Соответственно немного различается и техника работы с ними. Однако общий принцип проведения стерилизации в разных автоклавах один и тот же.

Перед работой осматривают автоклав и контрольно – измерительную аппаратуру. При наличии любой неисправности (смещение стрелки манометра с нуля, трещина на водомерной трубке и др.) работать с автоклавом нельзя. После осмотра автоклава в водопаровую камеру наливают воду до верхней отметки на водомерной трубке. В некоторых автоклавах предельный уровень заполнения водой контролируется воронкой. В стерилизационную камеру на специальную подставку помещают стерилизуемый материал. Предметы следует размещать не слишком плотно, так как пар должен свободно проходить, между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. Загрузив стерилизационную камеру, устанавливают и плотно завинчивают крышку (дверь) автоклава. Затем открывают кран, соединяющий стерилизационную камеру с наружным воздухом, и включают нагрев.

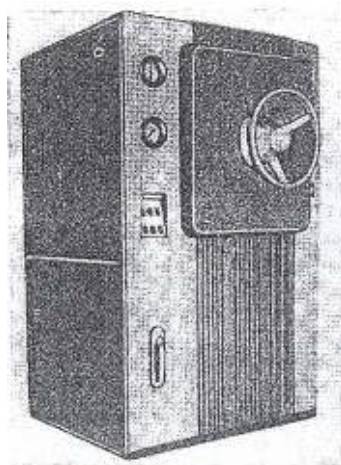


Рисунок 32. Автоклав автоматический

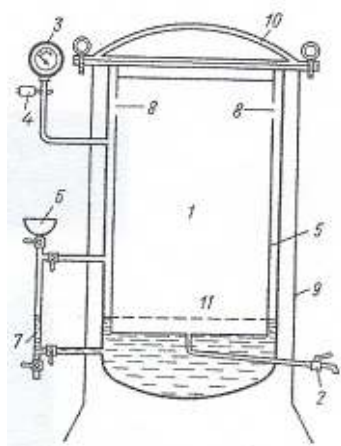


Рисунок 33. Схема автоклава: 1 -стерилизационная камера; 2 - кран для выхода воздуха; 3 - манометр; 4 – предохранительный клапан; 5 - водопаровая камера; 6 - воронка для заполнения автоклава водой; 7 – водомерная трубка; 8 - отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 9 - защитный кожух; 10 - крышка автоклава; 11 - подставка для размещения стерилизуемых предметов

После начала парообразования удаляют воздух из стерилизационной камеры. Это необходимое условие стерилизации, так как при одном и том же давлении температура чистого пара выше температуры смеси пара и воздуха. Поэтому если в автоклаве останется воздух, материал может не простерилизоваться. Наиболее простой и очень распространенный способ обезвоздушивания автоклава - вытеснение воздуха паром. Пар и конденсат отводят либо в сосуд с водой, либо в специальное устройство, соединенное с канализацией. В первом случае на кран (2) надевают резиновый шланг, который опускают в воду. Началом продувания считают появление устойчивой

непрерывной струи чистого пара. Пока в автоклаве еще имеется воздух, смесь воздуха и пара, проходя через воду, издаст сильный треск. Чистый пар выходит с равномерным шипящим звуком. Его пропускают в течение 10 мин. В целом вся операция с момента появления пара с воздухом должна занимать не более 15 - 20 мин. иначе в автоклаве останется мало воды и он может испортиться. Чтобы уменьшить расход пара (воды), кран открывают не полностью. Степень открывания крана устанавливают на практике при эксплуатации автоклава. В наиболее совершенных автоклавах воздух из стерилизационной камеры удаляют с помощью вакуумного насоса.

Когда воздух вытеснен, закрывают паропроводный кран, и давление пара доводят до показания, соответствующего режиму стерилизации. Режим автоклавирования часто выражают в единицах избыточного давления, указывая при этом продолжительность его поддержания. Например: стерилизация при 1 атм в течение 20 мин. На манометре автоклава обозначается именно то дополнительное давление, которое создается в автоклаве сверх нормального. Нередко режим автоклавирования характеризуют температурой и временем. Как только стрелка манометра дойдет до указателя определённого дополнительного давления и, следовательно, температура пара достигнет соответствующего значения, поддерживают давление на этом уровне необходимое время путем ручного или автоматического регулирования подачи пара. В автоклавах с огневым обогревом подачу пара регулируют интенсивностью горения, в автоматических автоклавах - электроконтактным манометром.

По окончании времени стерилизации выключают нагрев автоклава. Давление в автоклаве постепенно падает и сравнивается с атмосферным. Лишь после этого открывают кран, выводящий пар. Преждевременное открывание крана недопустимо, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала. Когда пар выйдет, открывают крышку (дверь) автоклава, соблюдая при этом осторожность во избежание ожога паром лица и рук. Удаление пара из стерилизационной камеры автоклавов, оснащенных

вакуумным насосом, осуществляют с помощью насоса. Одновременно происходит подсушивание стерильного материала.

Поскольку автоклав является аппаратом, работающим при высоких давлениях и температурах, неправильное обращение с ним может быть причиной несчастных случаев. Установка автоклава и работа с ним производятся при строгом и точном выполнении правил, указанных в прилагаемой к аппарату инструкции. К работе допускаются только подготовленные лица.

Подготовка сред к стерилизации. При автоклавировании 3 – 5% жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию.

Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками. Они предохраняют среду от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе. Пробки должны быть достаточно плотными, чтобы выполнить эту функцию, но с равномерным распределением волокон ваты, так как через них происходит газообмен культуры с окружающей средой. Слишком плотные пробки затрудняют снабжение культур воздухом.

Для приготовления пробки плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатывают валиком. Чтобы придать пробке прочность, ее прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Длина пробки для обычной пробирки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5 – 2,0 см (рис 34). Для сохранения формы пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Удобно обернуть пробку чистой марлевой салфеткой.

Перед стерилизацией пробки можно прикрыть бумажными колпачками. Нельзя обертывать пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, целлофаном. Фольгой или другими материалами, не пропускающими пар, так как пар должен обязательно проникать через

пробку в сосуд иначе среды не нагреются до нужной температуры и не простерилизуются. При использовании стеклянных, резиновых, корковых и других пробок их завёртывают в двойной слой обёрточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой. Пробки в сосуде меняют стерильно около пламени горелки.

Выбор режима автоклавирования. В микробиологической практике стерилизация в автоклавах осуществляется при температуре в пределах 111-138°C, т. е. от 0,5 до 2,5 атм. Температура ниже 111°C не может считаться надёжной; температура выше 138°C, как правило, не является необходимой, к тому же, чем выше давление пара, тем сложнее условия эксплуатации автоклава. При использовании автоклавов без вакуумных насосов наиболее надёжными считаются следующие режимы стерилизации: 15 - 45 мин при 121°C (1 атм) и 10 - 30 мин при 126 (1,5 атм).

Микробиологи чаще всего стерилизуют при 0,5 и 1 атм.

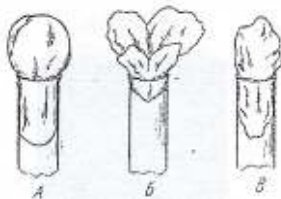


Рисунок 34. Ватные пробки: А – приготовлена правильно, Б и В – приготовлены неправильно

Таблица 2 - Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от объёма сосудов

Емкость	Объём		Время стерилизации при 121—123°, мин
	мм	мл	
Пробирки	18×150		12—14
	32×200		13—17
	38×200		15—20
Колбы тонкостенные		50	12—14
		125	12—14
		200	12—15
		500	17—22
		900	19—24
		1000	20—25
		1800	25—30
Колбы толстостенные		2000	30—35
		500	24—28
		1000	25—30
		2000	40—45
Матрацы		1000	30—35
Бутылки		9000	50—55
		100	13—17

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются прежде всего их составом, термоустойчивостью или термоллабильностью компонентов. Такие легко разрушающиеся субстраты, как молоко или желатиновые среды, а также субстраты, содержащие сахара, витамины (сусло пивное, соки, дрожжевой автолизат и др.) обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-30 мин. Мясо-пептонные среды можно стерилизовать при 1,0 атм 20 мин. Среда, содержащая агар, стерилизуется труднее, потому что стерилизация начинается фактически после того, как агар расплавится. Но и расплавленный агар требует для стерилизации вдвое больше времени, чем тот же объем воды. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например, тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поскольку они плохо передают тепло и очень медленно прогреваются. Их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при 160 в течение 2 ч или 1 ч при 170°C. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см.

Имеются субстраты, в которых могут быть споры, отличающиеся особой термостабильностью. К ним относится почва, причём она, кроме того,

и нагревается с замедленной скоростью. Ее обычно стерилизуют при 1 атм либо 1 раз 2 ч, либо два дня подряд по 1 ч, а иногда при 2 атм 2 ч.

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать рН среды. При кислой реакции многие вещества, входящие в её состав, могут подвергнуться гидролизу. Чем ниже значение рН, выше температура и больше продолжительность стерилизации, тем интенсивнее происходит гидролиз. В результате после стерилизации перестают застывать среды с желатином и даже с агаром. Если среда щелочная, то при стерилизации выпадают в осадок соли железа, карамелизуются и становятся непригодными для использования бактериями сахара. В некоторых случаях в процессе стерилизации изменяется рН среды. Так, если рН среды с углеводами выше 7,0, то может произойти ее подкисление до рН 6,0. Особенно часто это наблюдается в присутствии ксилозы. Чтобы избежать таких явлений, рекомендуется углеводы, фосфаты, соли железа автоклавировать отдельно в виде более или менее концентрированных растворов в дистиллированной воде при том значении рН, которое обеспечивает целостность вещества. После стерилизации растворы стерильно объединяют в нужном соотношении. Таким приемом раздельной стерилизации в микробиологии пользуются довольно часто, поскольку многие компоненты сред нельзя стерилизовать одним и тем же способом.

Режим автоклавирования в значительной степени зависит от объема стерилизуемого субстрата. Чем больше объем, тем больше времени при одной и той же температуре (давлении) требуется для обеспечения надежности стерилизации. Имеет значение толщина стенок и форма емкостей. Это нужно учитывать в практической работе. Например, не следует стерилизовать термочувствительный субстрат одновременно в пробирках и больших бутылках. Если среда стерилизуется по режимам, рекомендованным для малых объемов, содержимое бутылки может не простерилизоваться. Если же стерилизация проводится с расчётом на большой объем, среда в пробирке прогревается значительно дольше, чем требуется, и может испортиться.

После автоклавирования среды для проверки стерильности выдерживают 2-3 суток в термостате при 30°C. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново.

- Дробная стерилизация (тиндализация)

Дробная стерилизация применяется для обеззараживания сред, разрушающихся под действием температур выше 100°C. Этот прием был введен английским ученым Тиндалем. Принцип тиндализации заключается в том, что прогревают среду или ее компоненты без избыточного давления несколько раз, и в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорам. Предполагается, что развивающиеся из спор клетки погибают при последующем прогревании, не успев образовать новые споры. Прогревание можно осуществлять в парах кипящей воды, т. е. при 100°C или, как говорят, текучим паром. Обработку текучим паром проводят 3-4 раза по 20-40 мин в автоклаве с незакрытой крышкой, в кипятильнике Коха или на водяной бане с хорошо пригнанной крышкой. Время прогревания отмечается с момента энергичного выделения пара.

Кипятильник Коха представляет собой металлический цилиндр, обычно накрытый теплоизолирующим слоем, чаще всего - асбестом. Внутри цилиндра находится сетчатое ведро или подставка на ножках, куда помещают стерилизуемый материал, прикрыв его клеёнкой для защиты от конденсационной воды. На дно цилиндра наливают воду так, чтобы уровень ее не доходил до дна подставки. Кипятильник закрывают крышкой, в которой имеется отверстие для выхода пара, и нагревают с помощью газовой горелки или электричества. В современных аппаратах Коха имеются терморегуляторы.

В промежутки между прогреваниями среды помещают на сутки в термостат, отрегулированный на 30°C, для проращивания спор. Субстраты, не выдерживающие нагревания при 100°C, прогревают более осторожно: при 70-80°C по 1 ч ежедневно в течение 3 дней или при 60-65°C в течение 5 дней. Между нагреваниями их выдерживают при температуре от 25 до 37°C.

Тиндализация обеспечивает стерильность лишь в том случае, если среда, в которой находятся споры и поддерживаемая между прогреваниями температура

обеспечивает их прорастание, и с другой стороны, если появившиеся вегетативные клетки вновь не образуют термостойкие споры. Существенным недостатком дробной стерилизации является и то, что она требует большой затраты времени. Вот почему практическое значение тиндализации в настоящее время весьма ограничено. Этим способом пользуются преимущественно для стерилизации некоторых термолабильных лекарственных веществ и иногда - желатины.

- Стерилизация фильтрованием

Стерилизация фильтрованием широко используется в микробиологической практике. Она применяется для субстратов, не выдерживающих нагревания, например, для жидких сред и растворов, содержащих термолабильные белки, витамины, сахара, некоторые антибиотики, а также для сывороток, летучих веществ, например некоторых углеводов и других. Этим способом освобождают культуральную жидкость от клеток микроорганизмов, когда необходимо сохранить содержащиеся в ней продукты обмена в неизменном виде.

Способ заключается в пропускании жидкостей через специальные мелкопористые фильтры, называемые бактериальными. Микробные клетки задерживаются фильтрами главным образом механически, поскольку они крупнее диаметра пор фильтра, а также потому, что поры идут через фильтр чрезвычайно извилисто и на всём протяжении имеют разную форму и неодинаковый размер. Если же фильтр изготовлен из положительно заряженного материала, то имеет место и притягивание бактерий к стенкам пор, поскольку большинство микроорганизмов в водной суспензии имеет на своей поверхности отрицательный заряд. Такой фильтр может эффективно задерживать даже те микроорганизмы, средние размеры которых несколько меньше среднего диаметра пор. Тем не менее поры фильтров должны быть достаточно мелкими не только затем, чтобы обеспечить механическую задержку клеток, но и для того, чтобы микроорганизмы оказались в сфере действия электрического заряда стенок.

Диаметр пор определяет область применения фильтров. Стерилизующими бактериальными фильтрами теоретически можно считать такие, размер пор

которых не превышает 0,75 мкм. В практике пригодность фильтров для стерилизации устанавливают путем пробной фильтрации через них суспензии какого-либо мелкого микроорганизма, например *Pseudomonas aeruginosa*. Для проверки на стерильность фильтрат в большом количестве высеивают на питательную среду. Если в течение 5 дней тест – организм не вырастет, фильтры могут быть использованы для стерилизации. Как правило, бактериальные фильтры пропускают L – формы бактерий, вирусы и бактериофаги.

Типы бактериальных фильтров. Бактериальные фильтры изготавливаются из разных материалов. Они различаются по форме и диаметру пор, обычно указанному на упаковке фильтра или в прилагаемом паспорте. Нередко фильтры выпускаются под определёнными номерами и марками.

Мембранные (коллоидные) фильтры готовят на основе нитроцеллюлозы. Отечественная промышленность выпускает мембранные фильтры диаметром 35 мм. Они представляют собой диски – разного диаметра толщиной 0,1-0,5 мм. В зависимости от размеров пор они обозначаются номерами от 1 до 5.

Во Франции и США фирма «Миллипор» выпускает фильтры с размером пор от 0,01 до 14 мкм.

В последнее время получили распространение мембранные фильтры фабрики «Синпор» ЧССР.

Мембранные фильтры задерживают микроорганизмы почти исключительно благодаря малым размерам своих пор. Адсорбция здесь играет незначительную роль. Через эти фильтры пропускают небольшие объемы жидкости, так как при фильтровании больших объемов происходит закупорка пор и оно затрудняется. Кроме того, при длительном фильтровании возможно прорастание микроорганизмов внутри пор и попадание их в фильтрат. Мембранные фильтры, имеющие диаметр пор 0,1 мм или меньше, называют ультрафильтрами. Их используют для фильтрации вирусов и высокомолекулярных белков.

Асбестовые фильтры известны под названием фильтров Зейтца. Их изготавливают из смеси асбеста с целлюлозой в виде больших плотных (4-

6 мм толщиной) листов, которые затем разрезают на диски или квадраты разной величины. Верхняя поверхность пластин флокулирована. Плотность фильтров тем выше (т. е. меньше пористость), чем больше в них асбеста. На пористость фильтров указывают обозначения, имеющиеся на пластинах: индекс ЕК соответствует диаметру пор 1,5-1,8 мкм; ЕКС - 1,2-1,5; ЕКС-1 - 1-1,2; ЕКП 0,8-1 мкм. Кроме того, в СССР выпускаются асбестовые фильтры, обозначаемые марками Ф2 и СФ. Стерилизующими являются пластины СФ-3 и СФ-4.

Асбестовые фильтры имеют ряд недостатков. Один из основных связан с их химическим составом: при фильтровании из них могут вымываться щелочи, соли щелочных металлов, а иногда и соли железа.

Фильтрат загрязняется нежелательными примесями и приобретает щелочную реакцию. Это затруднение можно преодолеть путем предварительного промывания фильтра последовательно разведенной кислотой и дистиллированной водой или удалением первых порций фильтрата. Другой существенный недостаток фильтров Зейтца состоит в том, что асбест, будучи отрицательно заряженным, может адсорбировать значительные количества различных веществ из фильтруемой жидкости.

И, наконец, асбестовые фильтры нередко загрязняют фильтрат волокнами. Асбестовые пластины относительно, мягкие, они легко искривляются и разрываются. Помятые фильтры, а также пластики с надломами и трещинами для работы непригодны.

Фарфоровые фильтры были впервые предложены Пастером и Шамберланом в 1884 году. Впоследствии они получили название «свечи Шамберлана». Их изготавливают из смеси кварцевого песка и каолина, прокалённых на огне. Они имеют форму полого цилиндра, закрытого на одном конце. Верхняя часть цилиндра глазурованна. Особенно часто применяются свечи трех размеров: 10 X 55, 15 X 105 и 25 X 205 мм. Пористость их обозначается буквой L с цифрами от 1 до 13, соответственно увеличению плотности фильтра, т. е. уменьшению диаметра его пор - от 9 до 1,2 мкм. Мелкопористые свечи обозначаются также маркой «В», крупнопористые - маркой «F». Последние используются

только для фильтрации воды и отделения мелких микроорганизмов от крупных. Свечи Шамберлана имеют положительный заряд.

Фильтры из инфузорной земли готовят из диатомита или кизельгура, нередко с добавлением асбеста или других материалов. В России выпускается несколько типов таких фильтров под различными названиями. Чаще всего их называют «свечи Беркефельда». Это замкнутые с одного конца цилиндры 5-26 X 1,5-5 мм, имеющие в верхней части фарфоровую или металлическую головку. «Свечи Беркефельда» имеют обозначения W, N, и V, что соответствует диаметрам пор 3 – 4, 5 – 7, 8 – 12 мкм.

Фильтры из стекла. Стерилизующие стеклянные фильтры представляют собой двуслойные диски, изготавливаемые из фрагментов стекла «Пирекс» путем их сплавления. Нижний слой, имеющий пористость в пределах 15-40 мкм, служит подставкой. На ней лежит бактерионепроницаемый верхний слой. Это тонкая мелкопористая пластинка. По пористости такие пластинки разделяются на три типа: Р- диаметр пор меньше 1 мкм, М - от 1 до 1,7 мкм, С - больше 1,7 мкм. Но, поскольку стеклянные фильтры отличаются нестандартностью пор, в паспорте, прилагаемом к каждому фильтру, обычно указывается средний диаметр пор данного фильтра. Диски впаяны в стеклянные воронки-держатели. Форма их может быть разной. Особенно широкое распространение получили фильтры Нутча и воронки Бюхнера (рис. 35) с диаметром пластин от 30 до 120 мм.

Стеклянные фильтры имеют отрицательный заряд. Но они не столь активно адсорбируют вещества при фильтровании, как асбестовые, и не загрязняют фильтрат, поскольку материал фильтра из них не вымывается. Из-за нестандартности пор фильтры из стекла перед употреблением обязательно должны быть проверены на стерилизующий эффект.

В настоящее время из всех типов бактериальных фильтров для стерилизации наиболее широко применяются мембранные и асбестовые фильтры.

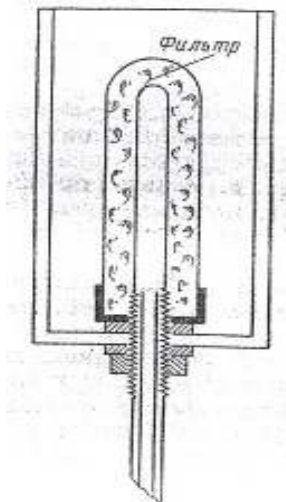


Рисунок 35. Свеча Беркефельда

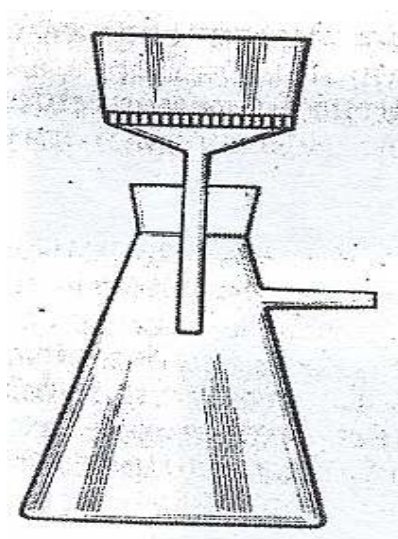


Рисунок 36. Стекланный фильтр (воронка Бюхнера), вмонтированная в колбу Бунзена

Работа с бактериальными фильтрами включает ряд этапов:

1. Подготовка фильтров. Фильтр должен быть закреплен в держателе, который вставляется в приемник фильтрата. Обычно приемником является колба Бунзена.

Для мембранных фильтров имеются многочисленные держатели. Есть, например, прибор, изготовленный целиком из стекла, в котором в качестве опоры фильтра используется крупнопористый стеклянный диск (рис. 37, А). Чаще применяются металлические и пластмассовые держатели. Все они приспособлены для дисков различного диаметра и рассчитаны на фильтрование разных объемов жидкостей.

Асбестовые фильтры монтируют в металлические основы, которые известны под названием «приборы Зейтца» (рис. 37, Б). Асбестовая пластина

крепко зажимается винтами между верхней (цилиндр без дна) и нижней (воронкообразный тубус) частями держателя. Опорой для асбестового диска служит сетка или пористая пластинка из нержавеющей стали. Трубка держателя, по которой стекает фильтрат, через резиновую пробку проходит в колбу Бунзена. Нередко весь этот прибор в собранном виде называют фильтром Зейтца.

Узкие свечи монтируют в стеклянные трубки с помощью резиновой пробки, которую вставляют в колбу Бунзена (рис. 38). Жидкость фильтруется из трубки внутрь свечи. Узкие свечи можно вставлять и непосредственно в резиновую пробку, закрывающую колбу Бунзена (рис. 39). В этом случае фильтрование происходит изнутри наружу.

Широкие свечи соединяют с колбой Бунзена резиновой трубкой (рис. 40).

Свечу помещают в сосуд, куда наливают фильтруемую жидкость.

Фильтрование при этом идет снаружи, а приемником является внутренняя полость свечи.

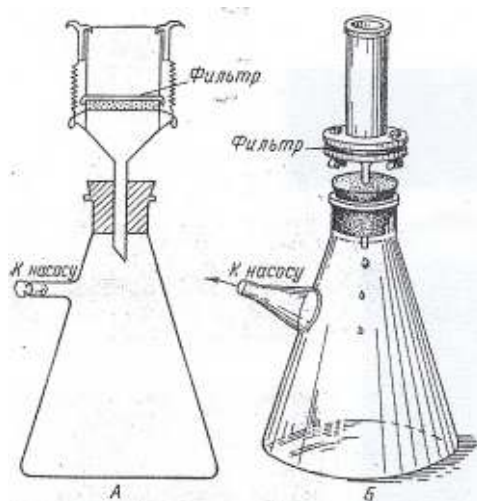
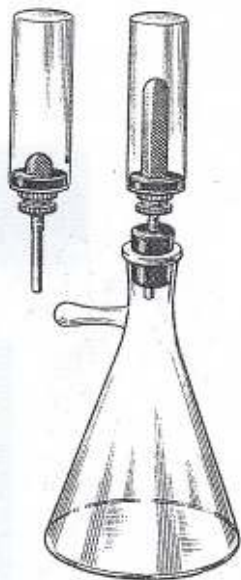


Рисунок 37. Приборы для стерилизации фильтрованием: А– со стеклянным держателем; Б – с металлическим держателем



8

Рисунок 38. Керамический фильтр, соединенный с колбой Бунзена при помощи наружного стеклянного цилиндра

Стеклянные фильтры, имеющие форму воронки, вставляют в резиновую пробку колбы Бунзена .

Перед использованием фильтры, их держатели и приемник фильтрата должны быть простерилизованы. А мембранные фильтры стерилизуют, поместив их в дистиллированную воду, кипячением в течение 30 мин или автоклавированием при 1 атм 15 мин. Сосуд с фильтрами должен быть закрыт ватной пробкой. Иногда мембранные фильтры стерилизуют химическими средствами: окисью этилена в смеси с углекислотой в течение 6 ч или парами формальдегида в течение 24 ч. В последнем случае фильтры помещают в эксикатор с разряженным воздухом, на дно которого наливают 2%-ный раствор формальдегида. Стерилизацию окисью этилена проводят в специальных аппаратах. После химической стерилизации фильтры проветривают в стерильных условиях не менее 5 ч.

Металлические и стеклянные держатели мембранных фильтров заворачивают в бумагу вместе с резиновой пробкой и автоклавируют при 1 атм 20-30 мин. Способ и режим стерилизации пластмассовых держателей определяется их термостойкостью. Стерилизация мембранных фильтров вместе с держателем не рекомендуется, так как это может привести к повреждению фильтра. Колбу Бунзена стерилизуют горячим воздухом или в автоклаве при 1 атм 20-30 мин. Предварительно горлышко колбы Бунзена закрывают ватной пробкой, а в отводную трубку, которая в дальнейшем присоединяется к

вакуумному насосу, вставляют ватный тампон. Весь прибор собирают непосредственно перед работой. Мембранные фильтры закладывают в держатель в стерильных условиях.

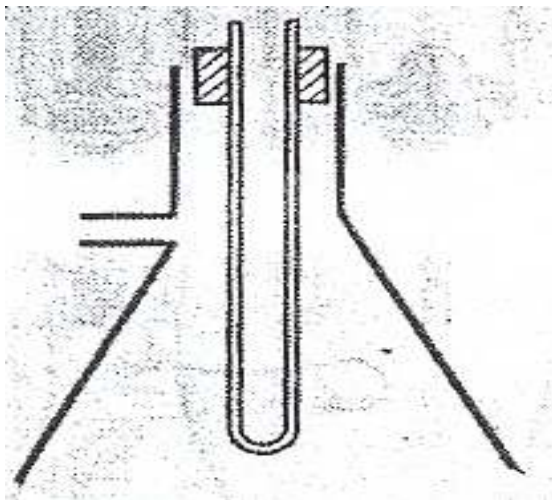


Рис 39. Керамический фильтр, вмонтированный в колбу Бунзена с помощью резиновой пробки

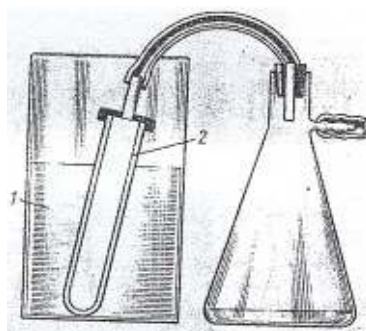


Рисунок 40. Керамический фильтр, соединенный с колбой Бунзена резиновой трубкой; 1 – фильтруемая жидкость, 2 - фильтр

Фильтры Зейтца стерилизуют в автоклаве при 1-1,5 атм 20 мин или горячим воздухом при 160°C в течение 1 ч в собранном виде, то есть вместе с асбестовыми пластинками. Не рекомендуется перед стерилизацией туго завинчивать винты держателя. Их подтягивают сразу после стерилизации.

Свечи чаще всего стерилизуют в автоклаве при 0,5-1 атм в течение 15 мин либо вместе с приемником, либо отдельно. В том случае, если свечи не соединены с резиновыми деталями, их можно стерилизовать горячим воздухом. Для сохранения стерильности свечи защищают от соприкосновения с воздухом тем или иным способом. Последнее зависит от того, как будет монтироваться прибор и в каком направлении пойдет фильтрование.

Стеклянные фильтры, вставленные в резиновые пробки, стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин вместе с колбой-приемником или

отдельно. В первом случае на воронку фильтра, закрытую ватной пробкой, надевают бумажный колпачок, во втором - фильтр с пробкой заворачивают в пергамент или алюминиевую фольгу. Стекланные фильтры, не соединенные с резиновой пробкой, можно стерилизовать горячим воздухом.

2.Фильтрование. Через бактериальные фильтры жидкости проходят медленно, а длительное фильтрование нежелательно, поскольку при этом, как уже отмечалось, возможно прорастание микроорганизмов в порах фильтров и загрязнение ими фильтрата. Поэтому обычно фильтрование ускоряют путем создания на фильтре перепада давления, достигаемого либо приложением повышенного давления к находящейся над фильтром жидкости, либо откачиванием воздуха с помощью вакуумного насоса, присоединенного к приемнику фильтрата. Чаще применяют откачивание воздуха. При этом происходит легкое разбухание клеток, чем облегчается их задержка на фильтре. Но в то же время в условиях вакуума возможно вспенивание фильтрата, содержащего белок, поэтому фильтрация под давлением, исключая это явление, считается более благоприятной, хотя, вероятно, и менее удобной в техническом отношении. Не исключено, что при сильном положительном давлении бактериальная клетка сжимается и может проходить через фильтр. Слишком большое разрежение и высокое давление ускоряют закупорку пор.

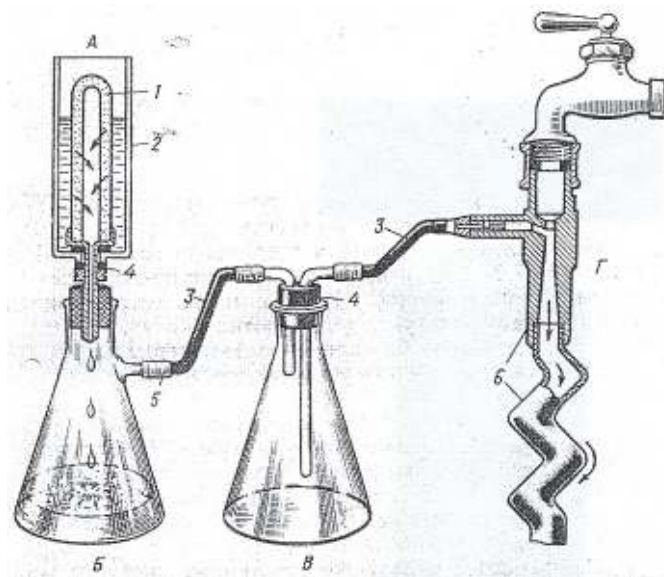


Рисунок 40. Прибор для фильтрования под вакуумом в собранном виде: А – держатель с фильтром; Б – приемник фильтрата; В – предохранительная склянка; Г – водоструйный насос; 1 – свеча; 2 – стеклянный сосуд; 3 – трубка из толстой резины; 4- резиновая пробка; 5 – ватный тампон; 6 – вакуумный насос

Фильтрация под вакуумом осуществляют следующим образом. Непосредственно перед работой ватную пробку колбы Бунзена, если она стерилизовалась отдельно, быстро заменяют держателем с фильтром, а отводной конец колбы соединяют с предохранительной склянкой, находящейся перед водоструйным насосом (рис. 41). Тампон из отводного конца не вынимают, чтобы сохранить стерильность приемника. По окончании фильтрации насос выключают постепенно, так как при резком изменении давления вода из крана может быстро заполнить предохранительную колбу и попасть в фильтрат. Профильтрованные жидкости разливают в стерильных условиях в заранее простерилизованную посуду. Так же, как и при термической стерилизации, их выдерживают 2-3 суток при 30°C и, если в них появится рост микроорганизмов, готовят вновь.

Важно помнить, что состав жидкостей, прошедших через бактериальные фильтры, может меняться вследствие вымывания из фильтров или, напротив, адсорбции на них ряда веществ, и фильтрат (среда) станет непригодным для культивирования данных микроорганизмов. Из асбестовых фильтров, как уже отмечалось, могут вымываться щелочи и различные соли. Адсорбируются же на фильтрах некоторые жирные кислоты, белки, полисахариды. Возможность и степень адсорбции веществ на фильтрах определяются химической природой фильтра, размерами его пор, продолжительностью фильтрации. Большую поглощательную ёмкость (до 30 и более процентов) имеют керамические (свечи) и асбестовые фильтры. Это важно учитывать при работе с малыми объёмами жидкостей.

Эффективность фильтрации определяется не только качествами фильтра, но и свойствами фильтруемой жидкости: её вязкостью, pH, температурой и др. Жидкости с низкой вязкостью фильтруются легче, поэтому при возможности вязкие жидкости разводят. Скорость фильтрации возрастает с повышением температуры, так как при этом снижается вязкость. Поэтому многие жидкости фильтруют подогретыми. Летучие жидкости нельзя фильтровать с помощью вакуума. Щелочная реакция среды (pH 7,2 – 8,0) и наличие капиллярно – активных веществ (бульон) облегчают фильтрацию. Некоторые вещества,

понижающие поверхностное натяжение, например, сыворотка, желчь, мыла, кислоты, способствуют проникновению бактерий через материалы, содержащие кремний. Трудно фильтруются гетерогенные системы, поэтому предварительно их осветляют пропусканием через свечи Шамберлана L1 или L2 через крупнопористые мембранные или даже бумажные фильтры.

3. Очистка бактериальных фильтров. Мембранные и асбестовые фильтры используются только один раз; после употребления их выбрасывают. Если стерилизации подвергалась жидкость, содержащая патогенные микроорганизмы, то фильтры, прежде чем выбросить, стерилизуют или выдерживают в дезинфицирующем растворе. Свечи Шамберлана и Беркефельда, а также стеклянные фильтры можно использовать повторно. При употреблении они загрязняются не только бактериями, но и органическими веществами. Для очистки фильтров применяют различные способы.

Фарфоровые свечи (Шамберлана) сначала промывают дистиллированной водой, пропуская ее через стенки фильтра в направлении, обратном фильтрованию. Затем фильтры заливают на ночь концентрированной серной кислотой, содержащей небольшие количества нитрата натрия и хлорнокислого калия. На следующий день их многократно промывают дистиллированной водой, а затем кипятят в воде для удаления растворенного воздуха. Свечи Шамберлана можно обрабатывать и другим способом. Их промывают в течение 10 ч в 3%-ном растворе фенола, затем в воде и 2%-ной жавелевой воде (KClO) в течение 2 ч и, наконец, моют щеткой в 10%-ной соляной кислоте также 2 ч. От кислоты фильтры отмывают в проточной воде в течение суток до исчезновения реакции на хлор, затем оставляют на ночь в дистиллированной воде. Третий вариант очистки заключается в следующем. Свечи сначала промывают теплой водой для удаления осадка и протирают мягкой щеткой, затем моют 2-3%-ным раствором формалина и, наконец, 15 %-ным раствором хлорной извести. Потом свечи выдерживают 30 мин в растворе соляной кислоты (1:10), кипятят в водопроводной воде 1 ч и отмывают водой. Свечи Беркефельда мягче фарфоровых, поэтому обработку щеткой они не выдерживают. При их чистке следует также избегать кислот. Они хорошо отмываются растворами гипохлорита. Промытые тем или иным способом свечи должны быть высушены.

Хранить их во влажном состоянии нельзя, так как при этом в их порах могут размножиться микроорганизмы, то есть появляется опасность загрязнения фильтра биомассой. Очищать свечи от частиц органического происхождения можно также прокаливанием их в муфельной печи.

Стеклянные фильтры обычно промывают раствором соляной кислоты или горячей концентрированной серной кислотой (80-100°C) при добавлении небольшого количества нитрата калия или смеси нитрата натрия и перхлората натрия и азотной кислоты. Фильтры рекомендуется держать в этой смеси в течение ночи. Затем их промывают дистиллированной водой до исчезновения ионов SO_4^{2-} .

Бактериальные фильтры нельзя мыть смесью двухромовокислого калия с серной кислотой, так как хромат адсорбируется на фильтре, что может повредить фильтр и испортить фильтрат. Свечи не следует также обрабатывать, концентрированными растворами щелочей, поскольку это может увеличить размеры их пор.

ГЛАВА 4

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование микроорганизмов является одним из основных методов микробиологии. От умения культивировать микроорганизмы в лабораторных условиях в значительной степени зависят успехи их изучения и практического применения. Культивирование основано на знании физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов и понимании значения физико-химических условий среды для их жизнедеятельности.

ПРИНЦИПЫ СОСТАВЛЕНИЯ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируют на питательных средах, поэтому питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Предложены сотни различных сред для

культивирования микроорганизмов, состав которых определяется потребностями микроорганизмов в соединениях, необходимых для биосинтеза и получения энергии. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разнообразны, поэтому столь же разнообразны их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота. И именно эти соединения определяют специфичность подавляющего большинства питательных сред.

По потребностям в углероде микроорганизмы принято делить на две большие группы - автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофные микроорганизмы способны в качестве единственного источника углерода использовать углекислоту - соединение, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. В соответствии с этим при культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация углекислоты в воздухе не превышает 0,03% и ее поступления в среду за счет диффузии недостаточно для интенсивного роста микроорганизмов. Поэтому в среды для культивирования автотрофов вносят бикарбонат натрия (NaHCO_3) или карбонаты, чаще всего углекислый кальций (CaCO_3). В некоторых случаях через среду продувают воздух, искусственно обогащенный 1-5% углекислоты.

Потребности гетеротрофных микроорганизмов не могут быть удовлетворены только углекислотой. Для их развития среда должна содержать органические соединения. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмы-гетеротрофы способны использовать различные соединения углерода - кислоты, спирты, углеводы, углеводороды, ароматические соединения. При этом потребности некоторых микроорганизмов, например ряда бактерий из семейства *Pseudomonadaceae*, могут быть удовлетворены широким набором различных органических веществ, тогда как другие микроорганизмы характеризуются высокой специализацией и способностью

использовать лишь немногие соединения углерода, Так, некоторые метаноокисляющие бактерии используют только метан и метанол.

Вторым основным компонентом питательной среды является источник азота. Азот входит в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме - в виде амино($-NH_2$) или имино($-NH$)-групп. Тем не менее потребности микроорганизмов в источнике азота могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную степень восстановленности. Для очень многих микроорганизмов это могут быть соли аммония. В этом случае в среды вносят NH_4Cl или $(NH_4)_2SO_4$. Следует, однако, помнить, что аммонийные соли – физиологически кислые соли, так как по мере использования иона аммония в среде накапливается анион соответствующей кислоты. Что приводит к заметному возрастанию кислотности среды и может отрицательно повлиять на развитие микроорганизмов. Гидроксид аммония (NH_4OH) в качестве источника азота используют редко, поскольку он вызывает сильное подщелачивание питательных сред.

Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Питательные среды для культивирования таких микроорганизмов содержат KNO_3 или $NaNO_3$. В отличие от солей аммония нитраты - физиологически щелочные соли, так как при использовании аниона NO_3^- в среде накапливаются катионы K^+ или Na^+ . Нитриты в кислых условиях для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника азота почти не используются.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов, более требовательных к азоту и соответственно обладающих меньшими биосинтетическими способностями, должны включать одну, несколько или полный набор аминокислот. Отдельные аминокислоты в L- или DL- форме добавляют к стерильной среде в концентрации от 0,1 до 0,05 г на 100 мл непосредственно перед посевом ее микроорганизмами. Для этого рекомендуется использовать растворы аминокислот, в которых концентрация превышает содержание аминокислоты в среде в 100 раз. Глицин, аланин, пролин, лизин и орнитин растворяют в дистиллированной воде, фенилаланин и триптофан - в

дистиллированной воде, подщелоченной NaOH, остальные аминокислоты - в дистиллированной воде, подкисленной HCl. Аминокислоты - цистин и цистеин, а также амиды - глутамин и аспарагин неустойчивы к нагреванию, поэтому их стерилизуют фильтрованием. Остальные аминокислоты можно стерилизовать при 0,5 атм в течение 15 мин.

Потребности микроорганизмов в нескольких аминокислотах часто удовлетворяют, добавляя к среде гидролизат белка. Для получения гидролизатов используют белки животного (мясо, рыбу, желатину, казеин) или растительного (семена сои, подсолнечника) происхождения, а также клетки микроорганизмов (дрожжи, водоросли, бактерии). Гидролиз проводят с помощью протеолитических ферментов или кипячением с минеральными кислотами либо с терпкими щелочами. Состав гидролизатов неодинаков и зависит от исходного субстрата, а также способа получения. Чаще других используют гидролизат казеина, который готовят в лаборатории, как правило, кислотным гидролизом. Для этого 20 г казеина заливают 200 мл воды, добавляют 10 мл концентрированной H_2SO_4 и выдерживают в автоклаве 4 ч при 1,5 атм. Однако при этом подвергается коррозии оборудование автоклава, поэтому чаще гидролизат казеина получают иначе. К 200 г казеина добавляют 280 мл 6н раствора HCl, и смесь кипятят с обратным холодильником 18 ч. Полученный гидролизат нейтрализуют 50%-ным раствором NaOH до pH 7, фильтруют; через бумажный фильтр и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Содержание аминного азота в гидролизате, полученном таким способом, составляет 700 – 1000 мг на 100 мл. Его добавляют к средам в таком количестве, чтобы концентрация по аминному азоту составляла 10-30 мг на 100 мл. Следует иметь в виду, что при кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан, в достаточно большой степени цистеин и незначительно серин и треонин. Имеется готовый препарат гидролизата казеина. Его вносят в среды от 0,1 до 1,0 г на 100 мл в зависимости от потребностей микроорганизмов.

Наиболее требовательные микроорганизмы культивируют на питательных средах, содержащих белки или продукты их неполного расщепления- пептоны. Пептоны представляют собой смесь поли- и

олигопептидов, аминокислот, органических азотных оснований, солей и микроэлементов. Их получают в результате воздействия протеолитических ферментов на белки животного (мышечный белок, казеин) или растительного (соевая мука) происхождения. В отечественных лабораториях чаще всего используют ферментативный пептон, выпускаемый Семипалатинским заводом. Это гигроскопический порошок светло-желтого цвета, полностью растворимый в воде; 1 %-ный раствор пептона имеет нейтральную или слабокислую реакцию. В питательные среды пептон добавляют от 1-2 до 20 г на 1 л.

Необходимо иметь в виду, что аминокислоты и пептон микроорганизмы могут использовать не только как источник азота, но и как источник углерода и энергии.

Некоторые бактерии способны использовать в качестве единственного источника азота молекулярный азот - N_2 . Это азотфиксаторы. В среды для культивирования таких микроорганизмов соединений азота можно не вносить. Снабжение азотфиксаторов газообразным азотом осуществляется благодаря соприкосновению среды с воздухом или культивированию в атмосфере азота.

Помимо источников углерода и азота многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, пурины, пиримидины и аминокислоты. Для того чтобы подчеркнуть потребность микроорганизмов в факторах роста, принято использовать термины «прототрофы» и «ауксотрофы». Прототрофы не нуждаются в факторах роста, для ауксотрофов абсолютно необходимо наличие в среде одного или нескольких факторов роста. Этими терминами особенно широко пользуются в литературе по генетике. Если потребности микроорганизмов в факторах роста ограничены одним или несколькими витаминами, то рекомендуется вносить их в культуральные среды, используя следующие концентрации: тиамин (витамин B_1), пантотенат Ca , рибофлавин (витамин B_2), никотиновая кислота (ниацин), пиридоксин, пиридоксамин, холин, кобаламин (витамин B_{12}) - по 1 мкг на 1 мл среды;

фолиевая кислота и п-аминобензойная кислота - по 0,05 мкг на 1 мл среды; биотин - 0,005 мкг на 1 мл среды.

Витамины добавляют к стерильной среде непосредственно перед ее засевом. Для этого рекомендуется использовать растворы, в которых концентрация витамина превышает его содержание в питательной среде в 100 раз. Растворы готовят в стерильной посуде и используют стерильную дистиллированную воду. Исключение составляют рибофлавин и фолиевая кислота. Рибофлавин растворяют в 0,02 н уксусной кислоте, а фолиевую кислоту - в 0,01 н NaOH, доводя затем концентрацию NaOH в растворе до 0,001 н. Полученные растворы стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане 3 мин. Раствор тиамин рекомендуется стерилизовать фильтрованием, так как при нагревании тиамин разрушается. При температуре +4 растворы витаминов сохраняются не менее месяца. Растворы фолиевой кислоты, пиридоксина и рибофлавина сохраняют в темноте, так как они светочувствительны.

Примерами смесей, содержащих факторы роста, могут служить дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, а также кукурузный экстракт. Дрожжевой экстракт вносят в среду для культивирования от 0,05 до 0,5 г на 100 мл, дрожжевой автолизат - в таком количестве, чтобы концентрация аминного азота составляла 5-30 мг на 100 мл среды. Дрожжевой экстракт имеется в продаже. Дрожжевой автолизат готовят следующим образом: 40 г свежих прессованных или 10 г сухих дрожжей заливают водой и перемешивают до получения гомогенной массы, затем добавляют несколько кристаллов тимола или 1-2 мл хлороформа и выдерживают в термостате при 50-55 °C 3 суток. За это время клетки дрожжей отмирают, а ферменты остаются активными и гидролизуют белки, а также другие биополимеры. Через 3 суток полученный автолизат после тщательного перемешивания кипятят на слабом огне 20 мин и фильтруют через бумажную пульпу, используя воронку Бюхнера. Содержание аминного азота определяют формальным титрованием. Дрожжевой автолизат стерилизуют при 0,5 атм 15 мин и сохраняют в холодильнике.

Кукурузный экстракт - готовый продукт заводов крахмало-паточной промышленности. Он содержит аминокислоты, витамины, достаточно большое количество органических кислот (молочной, уксусной и муравьиной) и

минеральные соли. Кукурузный экстракт вносят в среды от 0,5 до 5 г на 10 мл; стерилизуют при 0,5 атм.

Кроме источников углерода, азота и факторов роста микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы сера, фосфор и ряд других элементов. Все они должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Потребности разных групп микроорганизмов в сере, фосфоре и других зольных элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Поэтому так называемый «минеральный фон» сред для культивирования многих микроорганизмов может быть близким по составу. Так, потребности подавляющего большинства микроорганизмов в сере удовлетворяются сульфатами, хотя в клетке сера находится в основном в восстановленной форме, в виде сульфгидрильных групп. Значительно реже встречаются микроорганизмы, требующие наличия в среде восстановленной серы. В этом случае в среду вносят сульфиды, чаще всего Na_2S , или органические соединения, содержащие сульфгидрильные группы, например цистеин.

Соли фосфорной кислоты удовлетворяют потребности микроорганизмов в фосфоре. Все необходимые металлы - K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu - и другие элементы микроорганизмы получают в форме катионов или анионов неорганических солей. Например, источником магния служит MgSO_4 источником натрия и хлора - NaCl , кальция - CaCO_3 или CaCl_2 . Железо добавляют к средам в виде хлорида, сульфата или цитрата.

Для того чтобы избежать выпадения осадка в результате образования нерастворимых комплексов фосфатов с некоторыми катионами, особенно с железом и кальцием, к средам рекомендуется добавлять от 0,001 до 1 г/л этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) или гексаметафосфат натрия в концентрации 4 г/л. Комплексы, образуемые этими соединениями с катионами, служат резервом, из которого в результате диссоциации в раствор поступают свободные катионы.

Калий, магний, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, поэтому их соли, как правило, включают в состав питательных сред. Потребности микроорганизмов в марганце, молибдене, цинке, меди,

кобальте очень малы. Эти элементы, часто называемые микроэлементами, вносят в среды от 1 мг до 1 мкг на 1 л; более высокие концентрации могут быть токсичны. Питательные среды с пептоном, почвенной вытяжкой, дрожжевым экстрактом, гидролизатом казеина содержат необходимые микроэлементы. В состав синтетических сред, которые готовятся на дистиллированной воде, их следует вносить. Об оптимальных концентрациях микроэлементов для разных микроорганизмов известно мало, поэтому предложены различные по составу смеси микроэлементов.

Смесь микроэлементов по Дрюсу (Drews, 1976), мг: ЭДТА Na-800; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -10; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -4; CuSO_4 -1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -3; ZnCl_2 -2; LiCl -0,5; $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,5; H_3BO_3 -1, КВГ-2; КJ -2; BaCl_2 -0,5; вода дистиллированная-1000 мл; pH 6,0. На 1 л среды добавляют от 5 до 10 мл этого раствора.

Смесь микроэлементов по Пфеннигу (Pfennig, 1965), мг: ЭДТА-500; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -200; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -10; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -3; H_3BO_3 -30; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -20; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -1; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -3; вода дистиллированная - 1000 мл. На 1 л среды добавляют от 1 до 10 мл этого раствора. Растворы микроэлементов рекомендуется стерилизовать отдельно и вносить в среду непосредственно перед ее засевом.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов кроме соединений, необходимых для процессов биосинтеза, должны включать и энергетический материал. По способу получения энергии все микроорганизмы принято делить на две основные группы: хемотробы и фототрофы.

Хемотробы используют энергию окисления различных соединений. В зависимости от окисляемого субстрата (донора водорода) среди хемотробных организмов выделяют хемолитотрофы и хемоорганотрофы. Первые окисляют неорганические соединения, такие как H_2S , S^0 или другие не вполне окисленные соединения серы, H_2 , NH_4^+ , NO_2^- или Fe^{2+} . Эти соединения в средах для культивирования хемолитотрофных бактерий выполняют прежде всего функцию энергетического материала. Для

хемоорганотрофов энергетическим субстратом служат органические вещества, которые обычно играют двойную роль, являясь одновременно и источником углерода и источником энергии. Однако есть микроорганизмы, которые для конструктивных и энергетических процессов нуждаются в разных соединениях. Например, гомоферментативные молочнокислые бактерии получают энергию при сбраживании сахаров, но почти не используют их в процессах биосинтеза. Для конструктивных целей им необходимы готовые аминокислоты, пуриновые или пиримидиновые основания, витамины.

Фототрофы используют энергию света. Чтобы удовлетворить потребности этих бактерий в энергии, их культивируют при дневном или искусственном освещении.

По составу принято выделять естественные или натуральные среды неопределенного состава и синтетические среды.

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

На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и малопригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенный экстракт.

Мясо – пептонный бульон (МПБ). Основой для его приготовления служит мясная вода, которую обычно готовят следующим образом: 500 г

мяса, освобожденного от костей, жира и сухожилий, мелко нарезают или пропускают через мясорубку, заливают 1 л водопроводной воды и оставляют при комнатной температуре на 12 ч или в термостате при 30 на 6 ч, а при 37 - на 2 ч. За это время из мяса экстрагируются различные вещества, в том числе водорастворимые витамины. Затем мясо отжимают через марлю, и полученный настой кипятят 30 мин. При этом свертываются белки. Остывшую массу фильтруют через ватный фильтр и доливают водой до первоначального объёма. К мясной воде добавляют 1 % пептона и 0,5% NaCl.

МПБ - богатая питательная среда, но она почти не содержит углеводов. В случае необходимости их добавляют к МПБ чаще всего в количестве 1-2 г на 100 мл. МПБ стерилизуют при 1 атм.

Солодовое (неохмеленное пивное) сусло – хорошая среда для некоторых молочнокислых и уксуснокислых бактерий, дрожжей, микроскопических грибов и других представителей гетеротрофных микроорганизмов. Основные компоненты сусла - углеводы (до 90% от общей массы сухого остатка) и азотсодержащие соединения (до 6-7% от общей массы сухого остатка). Из углеводов в наибольшем количестве содержатся мальтоза и декстрины. В состав сусла входят витамины, преимущественно группы В, органические кислоты и минеральные соли.

Сусло готовят следующим образом. 250 г размолотого солода заливают 1 л водопроводной воды, нагревают до 48 - 50 и поддерживают эту температуру в течение получаса, непрерывно помешивая смесь, чтобы избежать образования комков. В последующие Полчаса температуру поднимают до 55-58 и поддерживают на этом уровне до полного осахаривания крахмала, т. е до тех пор, пока реакция остывшей смеси с йодом будет отрицательной. При указанном режиме происходит также гидролиз белков до аминокислот и пептидов. Полученный экстракт фильтруют через бумажную пульпу или вату. В фильтрате определяют концентрацию сахара, пользуясь ареометром Баллинга, градусы (°Б) которого примерно соответствуют процентному содержанию сахара в сусле. До нужной крепости сусло доводят водопроводной водой. Для культивирования микроскопических грибов чаще всего используют 3 – 4° Б сусло, для дрожжей – 6-8° Б , а для наиболее требовательных

молочнокислых бактерий – 8-12 ° Б сусло. Сусло стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Дрожжевая среда используется в основном для культивирования ряда гетеротрофных микроорганизмов. Основа дрожжевой среды – дрожжевая вода. Для её приготовления 70 – 100 г свежих прессованных или 7 – 10 г сухих дрожжей 30 мин кипятят в 1 л воды и после осаждения клеток дрожжей жидкость декантируют или фильтруют через вату. К фильтрату добавляют 1 л воды, ещё раз 30 мин кипятят и вновь фильтруют. К 100 мл полученной дрожжевой воды добавляют 1-2 г углеводов и минеральные соли, чаще всего K_2HPO_4 (0,1г) и NaCl (0,5 г). Доводят pH среды до 6,8-7,2. Среду стерилизуют при 0,5 атм 20 – 30 мин.

Картофельная среда используется в основном для культивирования спорообразующих бактерий, представителей рода *Caulobacter* и некоторых других хемоорганотрофных бактерий. Для приготовления этой среды 200 г тщательно вымытого и очищенного от кожуры и глазков картофеля нарезают мелкими ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды и кипятят 20 - 30 мин. Отвар фильтруют через вату, доводят объем фильтрата до 1 л и разливают в сосуды для культивирования. Среду стерилизуют 1 ч при 1 атм или 30 мин при 1,5 атм.

Почвенный экстракт используют главным образом для культивирования разнообразных представителей почвенной микрофлоры. Для его приготовления 500 г плодородной почвы заливают 1,5 л водопроводной воды и автоклавируют при 1 атм 30 мин. Полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр, добавляют к горячему фильтрату 0,5 г $CaCO_3$, тщательно перемешивают и через 5-7 мин фильтруют вновь. К экстракту, как правило, добавляют 0,2 г K_2HPO_4 на каждые 1000 мл. Стерилизуют при 1 атм.

Синтетические среды - это среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Синтетические среды широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов. Для разработки состава синтетических сред, обеспечивающих рост микроорганизмов или усиленный биосинтез какого-либо продукта жизнедеятельности, необходимо знать

особенности обмена веществ данного организма и потребности его в источниках питания. В настоящее время в распоряжении микробиологов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам натуральным средам неопределенного состава. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть, и довольно простыми по составу. Рецепты некоторых синтетических сред приведены в приложении.

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

Следует иметь в виду, что среды, обеспечивающие хорошее развитие микроорганизмов всегда подходят для решения других исследовательских и практических задач, так как далеко не во всех случаях накопление какого либо продукта жизнедеятельности - фермента, витамина, антибиотика и т. д. идет параллельно накоплению биомассы.

Нередко при обильном росте микроорганизмов, желаемый продукт метаболизма почти не образуется или образуется в недостаточном количестве. Чтобы обеспечить необходимого соединения в максимально возможных количествах, применяются специальные среды. Подбор концентрации и соотношения компонентов среды осуществляют, используя методы математического планирования эксперимента, которые достаточно подробно изложены в книге В. Н. Максимова (1980).

Элективные среды предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественно развитие определённой группы микроорганизмов, для которой характерна общность физиологических свойств. Подробнее об этих средах см. с. 108 – 109.

Дифференциально – диагностические (индикаторные) среды дают

Возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Примером индикаторной среды для выявления бактерий из группы кишечной палочки в естественных субстратах служит агаризованная среда Эндо следующего состава, г: пептон-10; лактоза-10; K_2HPO_4 -3,5; $NaHSO_3$ -2,5; агар - 150; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7,4. К среде добавляется 4 мл 10%-ного спиртового раствора основного фуксина. Среду стерилизуют при 1 атм 15 мин и сохраняют в темноте. Бактерии из рода *Escherichia* на этой среде образуют малиновые колонии с металлическим блеском.

При определении видовой принадлежности бактерий используют pH-индикаторные среды, в состав которых входит один из индикаторов – нейтральный красный (0,0005%), феноловый красный (0,005%) или бромтимоловый синий (0,0005%). Если развитие микроорганизмов сопровождается образованием кислоты или щелочи, цвет индикатора изменяется, Дифференциально-диагностические среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие и плотные среды.

Жидкие среды широко применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, а также для поддержания и сохранения в коллекции культур микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений, а также в коллекциях для сохранения культур микроорганизмов. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором.

Плотные среды используют для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, для определения количества микроорганизмов, их антибиотической активности, для хранения культур в

коллекциях и в ряде других случаев. С целью уплотнения сред применяют агар или желатин. Плотной основой могут служить пластинки силиката, которые пропитывают питательной средой.

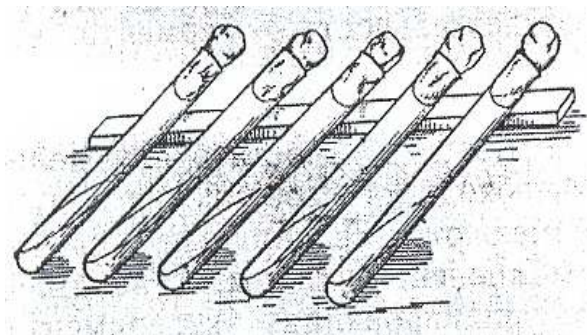


Рисунок 41. Приготовление скошенной агаризованной среды в пробирках

Агар используют для уплотнения сред особенно часто. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входит сахароза и агаропектин. Кроме того, агар включает небольшое количество легко ассимилируемых веществ и различные соли. Агар получают из некоторых морских водорослей и выпускают в виде пластин, стебельков или порошка. Агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при 100 °С и затвердевает при температуре 40°С.

Поэтому на агаризованных средах можно культивировать значительную часть известных в настоящее время микроорганизмов.

Чаще всего агар добавляют к средам в количестве 1,5%. Если необходимо получить более влажную среду, вносят 1,0%, а более плотную и сухую – 2-3% агара. Среду с агаром нагревают на кипящей водяной бане до полного его расплавления. Если предполагают выращивать микроорганизмы на скошенной агаризованной среде в пробирках, то каждую пробирку заполняют средой не более чем на 1/3. Чтобы среда не подсыхала, ее скашивают после стерилизации, перед посевом. Для этого пробирки с расплавленной на кипящей водяной бане средой устанавливают в наклонном положении (рис. 41) и дают среде застыть. Скошенная агаризованная среда не должна доходить до ватной пробки на 4-6 см. Среду, предназначенную для культивирования бактерий в чашках Петри, разливают по 20-25 мл в пробирки большего объема, чем для скошенной агаризованной среды, или стерилизуют в колбах. В последнем случае до стерилизации агар не расплавляют.

При остывании агаризованных сред образуется конденсационная вода. Чем меньше концентрация агара, тем больше выделяется воды. Поэтому при выращивании микроорганизмов на поверхности агаризованных сред в чашках Петри с целью получения изолированных колоний чашки помещают в термостат крышками вниз. В противном случае на внутренней стороне крышки скапливается конденсат, который, стекая на поверхность среды, мешает получению изолированных колоний.

Агар имеет слабощелочную реакцию, поэтому его добавление может привести к незначительному повышению pH среды. В слабокислых, нейтральных или слабощелочных средах агар сохраняет способность образовывать гель после нескольких циклов плавления и затвердевания и даже после повторной стерилизации. Однако необходимо помнить, что при pH среды ниже 5,5 агар при стерилизации частично гидролизуются и поэтому теряет способность образовывать гель, т. е. не застывает. В этом случае его стерилизуют отдельно от среды в определенном объеме воды, расплавляют на водяной бане и приливают при постоянном перемешивании к стерильной, предварительно подогретой среде.

Агар, как указывалось выше, содержит примеси органических и минеральных веществ, которые иногда нежелательны. Чтобы избавиться от большинства из них, поступают следующим образом. Агар заливают водопроводной водой и ставят в термостат на 30-37. Примеси вымываются в воду и разлагаются под действием развивающихся в ней микроорганизмов. Через день-два жидкость сливают, агар промывают несколько раз свежей водой, снова заливают водой и вновь ставят в термостат. Когда и эта вода помутнеет, то ее опять заменяют новой, и так делают до тех пор, пока не исчезнет запах, а вода не перестанет мутнеть. Обычно через 2-3 недели получают агар, почти лишенный растворимых органических и минеральных веществ. Воду сливают, агар помещают в двойной марлевый мешок и 2-3 суток промывают проточной водопроводной водой, затем раскладывают его тонким слоем и просушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 40-50.

Желатин - это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном - белком костей, хрящей, сухожилий, чешуи. Образующий желатином гель

плавится при температуре 25°C, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30 - 37°C). Кроме того, желатин разжижается протеолитическими ферментами, которые многие микроорганизмы выделяют в среду. Эти свойства желатина ограничивают его применение в качестве уплотняющего средства. Желатин используют главным образом в диагностических целях – для выявления протеолитической активности микроорганизмов, а также для получения гигантских и глубинных колоний дрожжей. В первом случае употребляют мясо – пептонный, во втором – сусловый желатин.

К жидким средам добавляют 10 – 20% желатин, оставляют набухать 5-10 мин и нагревают на водяной бане до растворения. Доводят pH среды до 6,8-7,0. Желатин имеет кислую реакцию и обладает большой буферностью, поэтому на нейтрализацию идет больше щелочи, чем, например, на нейтрализацию МПА. Желатиновые среды стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или дробно - 3 раза по 20 мин в кипятильнике Коха. Повторная стерилизация желатиновых сред, особенно при pH сред ниже 6,0 или выше 7,3 не рекомендуется, поскольку желатин частично гидролизует и теряет гелеобразующие свойства.

Кремнекислый гель (силикагель) используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава.

Гель готовят следующим образом. К соляной кислоте плотностью

1,1 добавляют при перемешивании равный объем раствора жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) той же плотности. Смесь разливают в чашки Петри по 20-30 мл в каждую и оставляют чашки на горизонтальной поверхности на несколько часов до образования кремнекислого геля. Когда гель станет плотным, открытые чашки помещают в стеклянный или эмалированный сосуд, промывают 2-3 суток проточной водой для удаления хлоридов, а затем несколько раз горячей дистиллированной водой. Об отсутствии хлоридов судят по качественной пробе промывных вод с 1 – 5%-ным раствором азотнокислого серебра: при наличии хлоридов образуется белый осадок. Отмытые от хлора пластинки пропитывают 2-3 мл концентрированной среды, содержание компонентов в которой в 5-10 раз выше, чем в соответствующей

жидкой среде. Затем чашки с гелевыми пластинками помешают открытыми в сушильный шкаф и подсушивают при 50-60, следя за тем, чтобы гель не растрескался и его поверхность осталась влажной. Если необходимо, чашки заворачивают в бумагу и, не переворачивая, стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 15 мин. Пластинки, предназначенные для выделения и культивирования автотрофных бактерий, можно не стерилизовать. Стерилизуют только среду, которой пропитывают гель. Чашки с силикагелевыми пластинками сохраняют до употребления под водой.

Некоторые специфические особенности агар, желатин и кремнекислого геля суммированы в таблице 3.

Таблица 3.-Основные особенности веществ, употребляемых для уплотнения питательных сред

Показатели	Агар	Желатина	Кремнекислый гель
Исходный материал для получения	морские водоросли	кожа, кости, хрящи	кремнекислый калий или натрий и соляная кислота
Основные компоненты	полисахариды	белки	кремневая кислота
Температура плавления, °С	100	22—25	—
Температура застывания, °С	40	22—25	—
Действие протеаз	не действуют	действуют	не действуют
Конденсационная вода	выделяется	не выделяется	не выделяется
Употребляемая концентрация, %	1,0—3,0	10—20	—

Следует помнить, что все среды с агаром или желатином следует относить к натуральным средам неопределенного состава.

Осветление сред. Осветленные агаризованные или желатиновые среды необходимы для некоторых специальных исследований, например для получения хорошо видимых изолированных колоний анаэробных микроорганизмов.

В ряде случаев прозрачную среду можно получить, отфильтровав ее от осадка через гигроскопическую вату. Когда этого бывает недостаточно, среды

осветляют с помощью белков куриного яйца. Для осветления 500 мл среды достаточно белка одного яйца. Белок отделяют от желтка и встряхивают с равным объемом воды до образования сплошной пены. Взбитый белок выливают в предварительно расплавленную и остуженную до 45-50 среду. Перед внесением белка проверяют рН и, если необходимо, подщелачивают среду до рН 7,0-7,3. Среду с белком тщательно перемешивают и прогревают при 100 в автоклаве или в кипятильнике Коха в течение часа. Белок свертывается и адсорбирует все взвешенные в среде частицы. Когда свернувшийся белок поднимется на поверхность или опустится вниз, среду быстро отфильтровывают в горячем виде через вату. При этом удобно пользоваться специально подогреваемыми подставками для воронок, благодаря которым предотвращается застывание среды во время фильтрования.

Синтетические агаризованные среды, в которые вносить белок нежелательно, осветляют следующим образом. Среду наливают в химический стакан, автоклавируют и оставляют после стерилизации в закрытом автоклаве на 10-12 ч, обычно на ночь. При таком медленном остывании все взвешенные частицы оседают на дно. Застывшую агаризованную среду извлекают из стакана, верхнюю, прозрачную часть срезают, помещают в колбу и вновь стерилизуют.

* * *

Посуда, предназначенная для приготовления сред и культивирования микроорганизмов, не должна содержать посторонних веществ. Лучше всего пользоваться стеклянной посудой. Новую стеклянную посуду моют и погружают на ночь в 1-2%-ный раствор соляной или серной кислот, затем многократно промывают водой и высушивают. Иногда для работы с микроэлементами, витаминами, синтетическими и другими средами требуется особо тщательная очистка посуды. Натуральные среды неопределённого состава можно готовить в эмалированной посуде.

Не следует готовить впрок больших запасов сред, так как они высыхают, концентрируются и становятся непригодными. Сохраняют среды в прохладном, защищенном от света и не слишком влажном помещении. В сырости ватные пробки пропитываются влагой и через них может прорасти

мицелий микроскопических грибов. Каждый сосуд со средой должен иметь этикетку с обозначением состава (названия) среды и времени ее приготовления.

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Активная кислотность среды

Активная кислотность среды (pH) имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше всего растет при pH, близком к 7,0, напротив, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среды. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определить значение pH. Измеряют pH электрометрическим методом на потенциометре. В лабораторной практике удобно использовать различные жидкие или бумажные индикаторы. Широко применяется, например, жидкий двухцветный индикатор, бромтимоловый синий (бромтимолблау). Его цвет изменяется от желтого к синему при сдвиге pH от 6,0 до 7,6. При pH 7,3 индикатор имеет сине-зеленую окраску. Используют также универсальный индикатор, который изменяет окраску в интервале pH от 2 до 10.

В случае необходимости pH сред доводят до нужного значения растворами кислот (HCl , H_2SO_4), щелочей (NaOH , KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (Na_2CO_3 , NaHCO_3). Для корректировки pH целесообразно иметь растворы разной концентрации. pH сред может измениться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести до нужного значения, если это требуется, стерильными растворами кислоты или щелочи.

Активная кислотность питательной среды, благоприятная для начального роста, достаточно часто меняется в процессе культивирования микроорганизмов. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных

компонентов среды. Например, при сбраживании углеводов в среде накапливаются органические кислоты, снижающие pH среды. В средах с KNO_3 pH возрастает, как уже отмечалось, благодаря более интенсивному потреблению нитрат-иона и накоплению ионов калия.

Чтобы не допустить чрезмерного изменения pH в культурах микроорганизмов и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы (см.

Приложение). В микробиологической практике чаще других применяют фосфатные буферы. Однако если рост микроорганизмов сопровождается образованием большого количества кислот, то тех количеств буферного раствора, которые можно добавлять к средам (не более 5 г фосфатов на 1 л среды), оказывается недостаточно, так как противодействие любого буфера изменению pH не беспредельно. Поэтому для микроорганизмов, активно изменяющих кислотность среды, применение буферов неэффективно. При культивировании таких микроорганизмов в среды вводят избыточное количество мела, который нейтрализует образующиеся кислоты. Можно нейтрализовать образующиеся кислоты по ходу развития культуры 10%-ным стерильным раствором NaHCO_3 .

Поддержание определенного значения pH во время роста особенно важно для тех микроорганизмов, которые образуют в процессе жизнедеятельности кислоты, но не обладают устойчивостью к ним. К их числу относятся молочнокислые бактерии, а также многие псевдомонады. Большие затруднения встречаются, когда нужно поддерживать pH в слабощелочных средах, так как для диапазона pH от 7,2 до 8,5 подходящих буферов не существует. Поэтому иногда приходится периодически или непрерывно доводить pH до нужной величины, добавляя стерильно в среду растворы кислоты или щелочи при постоянном контроле значения pH. В современных ферментерах это достигается с помощью специальных автоматических устройств.

Аэрация

Кислород входит в состав воды и органических соединений, поэтому поступает в клетки всегда в больших количествах. Однако многие микроорганизмы нуждаются в постоянном притоке молекулярного кислорода.

Такие микроорганизмы принято объединять в группу облигатных аэробов. Энергетическим процессом у них является аэробное дыхание, а молекулярный кислород играет роль терминального окислителя. Среди облигатных аэробов выделяют группу микроаэрофильных микроорганизмов, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении меньшем, чем в воздухе. Развитие других микроорганизмов, напротив, возможно только, в отсутствие кислорода. Получение энергии у этих микроорганизмов не связано с использованием молекулярного кислорода. Для многих из них кислород токсичен – он угнетает рост или вызывает гибель клеток. Такие микроорганизмы называют облигатными анаэробами. Среди микроорганизмов выделяют также группу факультативных анаэробов, представители которой способны расти как в присутствии, так и в отсутствие молекулярного кислорода. Например, некоторые дрожжи или энтеробактерии в зависимости от наличия кислорода осуществляют аэробное дыхание или брожение.

Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия и в способах их культивирования.

Способы культивирования аэробных микроорганизмов

Культивирование на поверхности плотных и жидких сред. В этом

случае микроорганизмы выращиваются на поверхности плотной среды

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

Глубинное культивирование в жидких средах. Все способы глубинного культивирования аэробных микроорганизмов сводятся к увеличению поверхности соприкосновения питательной среды с кислородом воздуха. Следует иметь в виду, что при глубинном культивировании в жидких средах микроорганизмы используют растворённый кислород. Вместе с тем растворимость кислорода в воде невелика. Поэтому, чтобы обеспечить рост аэробных микроорганизмов в толще среды, её необходимо постоянно аэрировать.

Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на качалках, обеспечивающих встряхивание или вращение колб или пробирок со скоростью 100-200 и более оборотов в минуту. Чем больше скорость вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом. Увеличить аэрацию среды при работе на одной и той же качалке можно уменьшением объема среды или применением колб с отбойниками – вдавлениями внутрь в виде 4-8 отростков 2-3 см длиной. При вращении колб с отбойниками поверхность соприкосновения среды с воздухом заметно увеличивается благодаря разбрызгиванию жидкости, тем выше аэрация.

Интенсивность аэрации при выращивании микроорганизмов на качалках характеризуют, как правило, скоростью поглощения кислорода водным раствором сульфита. Раствор сульфита наливают в сосуды для культивирования вместо питательной среды и через определенные промежутки времени измеряют количество окисленного сульфита в тех же условиях аэрации, при которых выращиваются исследуемые микроорганизмы. Метод подробно описан в «Практикуме по микробиологии» (1976). Сульфитный метод не дает возможности определить концентрацию кислорода в культуре. Концентрацию кислорода, растворенного в культуральной жидкости, определяют полярографически.

Помимо перемешивания, аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием через толщу среды стерильного воздуха. Этот способ часто используется в лабораторных исследованиях, но особенно широкое применение он нашел в промышленной микробиологии при получении

биомассы и различных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов - антибиотиков, ферментов, кислот. Скорость протекания воздуха через среду необходимо контролировать. Для этого используют различные приборы: газовые часы, реометры и другие. В ферментерах количество пропускаемого воздуха поддерживается на заданном уровне автоматически. Воздух стерилизуется путем прохождения через активированный древесный уголь, стеклянную вату, пропитанную антисептиком, или специальные ткани из полимеров. В лабораторных опытах, когда объем и скорость поступления воздуха невелики, используют заранее простерилизованные ватные фильтры. Для возможно более сильного распыления воздух пропускают через мелкопористые пластинки - барбатеры; в лабораторных опытах с этой целью применяют стеклянные фильтры.

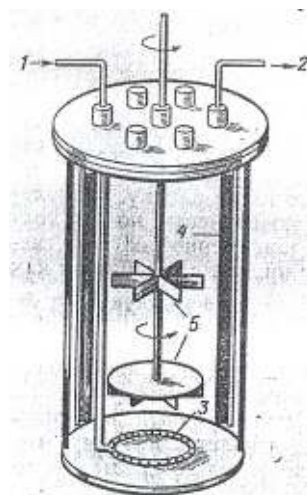


Рисунок 42. Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов: 1 — вход для воздуха, 2 — выход воздуха, 3 — барбатор, 4 — отбойники, 5 - мешалка

Для аэрации культур микроорганизмов, как правило, используют обычный воздух. Продувание сред Кислородом не рекомендуется, так как чрезмерное насыщение среды кислородом (до 40 мг/л) может привести к угнетению роста микроорганизмов. В ферментерах принудительную аэрацию обычно совмещают с механическим перемешиванием среды мешалками, скорость вращения которых может достигать сотен и даже тысяч оборотов в минуту. Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов приведена на рис. 42.

Необходимо помнить, что потребности в свободном кислороде у различных аэробных микроорганизмов неодинаковы, поэтому степень аэрации следует подбирать экспериментально для каждой культуры.

Способы культивирования анаэробных микроорганизмов

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

Выращивание в высоком слое среды. Это наиболее простой способ ограничения доступа воздуха к культуре. Жидкую среду наливают в сосуды для культивирования высшим слоем. Так как нельзя стерилизовать среды, если они занимают более половины высоты сосуда, часть среды стерилизуют отдельно и стерильно доливают ею сосуд для культивирования сразу же после посева. Непосредственно перед посевом среду кипятят или прогревают на кипящей водяной бане 30-40 мин, затем быстро охлаждают, чтобы в ней не успел раствориться кислород воздуха, и вносят на дно посевной материал.

Если развитие микроорганизмов не сопровождается газообразованием, поверхность среды можно залить слоем стерильного вазелинового масла, парафина или их смесью (соотношение 1 : 3), слоем стерильного водного агара либо закрыть сосуды для культивирования стерильными пробками: стеклянной притертой или резиновой.

Культивирование в вязких средах. Диффузия кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости. Поэтому в вязких средах, таких как картофельная или среды с кукурузной либо другой мукой, хорошо развиваются некоторые облигатные анаэробы, например, возбудители маслянокислого или ацетонобутилового брожения. Вязкость жидких сред легко увеличить, если добавить к ним 0,2-0,3 % агара.

Выращивание в толще плотной среды. Этим приемом пользуются для получения изолированных колоний при выделении чистых культур или определении численности анаэробных микроорганизмов. Посевной материал

вносят в расплавленную и остуженную до 48-50 агаризованную, желательно осветленную среду, тщательно перемешивают и оставляют в пробирках или переливают стерильной пипеткой в заранее простерилизованные трубки Бурри или чашки Петри. Поверхность среды в пробирках заливают парафином. Трубки Бурри – это стеклянные трубки, длиной 20-25 см, диаметром 1,0- 1,5 см. Трубки стерилизуют, закрыв оба конца ватными пробками. Перед посевом ватную пробку у одного конца заменяют стерильной резиновой, через другой конец трубки вносят среду с посевным материалом и закрывают этот конец также резиновой пробкой (рис. 43).

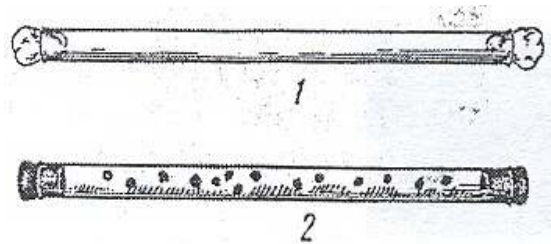


Рисунок 43. Трубка Бурри: 1 – трубка. Подготовленная к стерилизации; 2 – колонии анаэробных микроорганизмов в толще агаризованной среды

При использовании чашек Петри для выращивания анаэробов засеянную агаризованную среду наливают в крышку чашки и, после того как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки, где среда соприкасается с воздухом, заливают стерильным парафином (рис. 44).

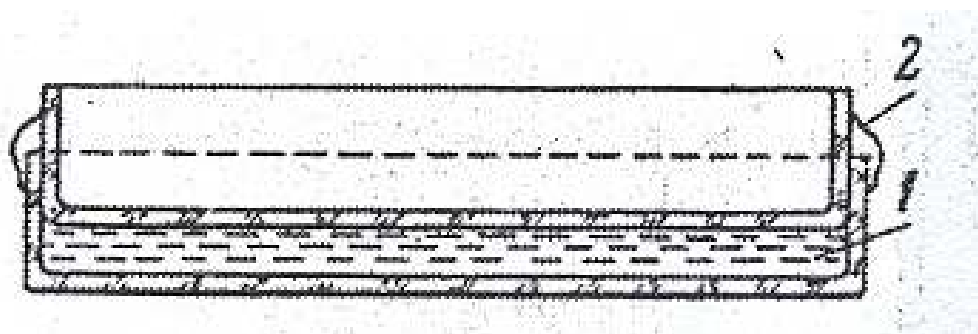


Рисунок 44. Культивирование анаэробов в чашке Петри: 1- агаризованная среда, 2 – парафин



Рисунок 45. Микроанаэростат

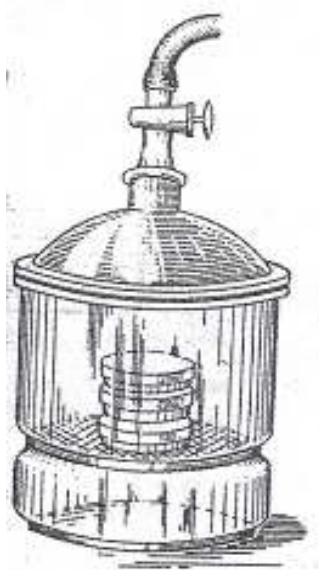


Рисунок 46. Стекло́нный вакуумный эксикатор

Выращивание в анаэростатах. Анаэробные микроорганизмы можно выращивать в анаэростатах - вакуумных металлических камерах, снабженных манометром (рис. 45). Анаэростатом может служить обычный вакуумный стеклянный эксикатор (рис. 46). Из анаэростата откачивают воздух, а затем, как правило, заполняют его газовой смесью, состоящей из азота (90-80%) и углекислоты (10-20%) до давления порядка $67 \cdot 10^3$ Па (500 мм рт. ст.). Избыточное давление исключает возможность диффузии кислорода воздуха. Для заполнения анаэростатов газовой смесью используют газометры (рис. 47). Газометр (А) заполняется отдельным газом или газовой смесью через кран 1. Жидкость, первоначально заполняющая газометр, через кран 2 (кран 3 при этом закрыт) вытесняется в сосуд Б. Затем кран 1 закрывают, осторожно открывают кран 3, и жидкость из сосуда Б поступает в газометр и вытесняет газ в анаэростат (В). Объем газа, заполняющего анаэростат, измеряют по объему

жидкости, поступившей из сосуда Б в газометр. Необходимо помнить, что выпускаемые промышленностью газы даже высокой чистоты содержат, как правило, небольшие количества кислорода. Поэтому, чтобы очистить газы от остатков кислорода, их пропускают через химические поглотители, например, через колонки с раскаленной восстановленной металлической медью.

Для удаления кислорода из окружающей среды при культивировании анаэробов иногда используют вещества, поглощающие кислород. Эти вещества можно поместить на дно большой пробирки, имеющей специальную подставку, на которую ставят пробирку с бактериальной культурой. Удобно использовать специальные сосуды, во внешнюю расширенную часть которых вносят поглощающую смесь, а во внутреннюю - питательную среду с микроорганизмами. Культуральный сосуд закрывают ватной пробкой, а сосуд с поглотителем - резиновой, что обеспечивает герметичность системы (рис. 48). Применяют также вакуумные или обычные эксикаторы, в которые на дно или в специальные сосуды помещают поглощающие кислород вещества.

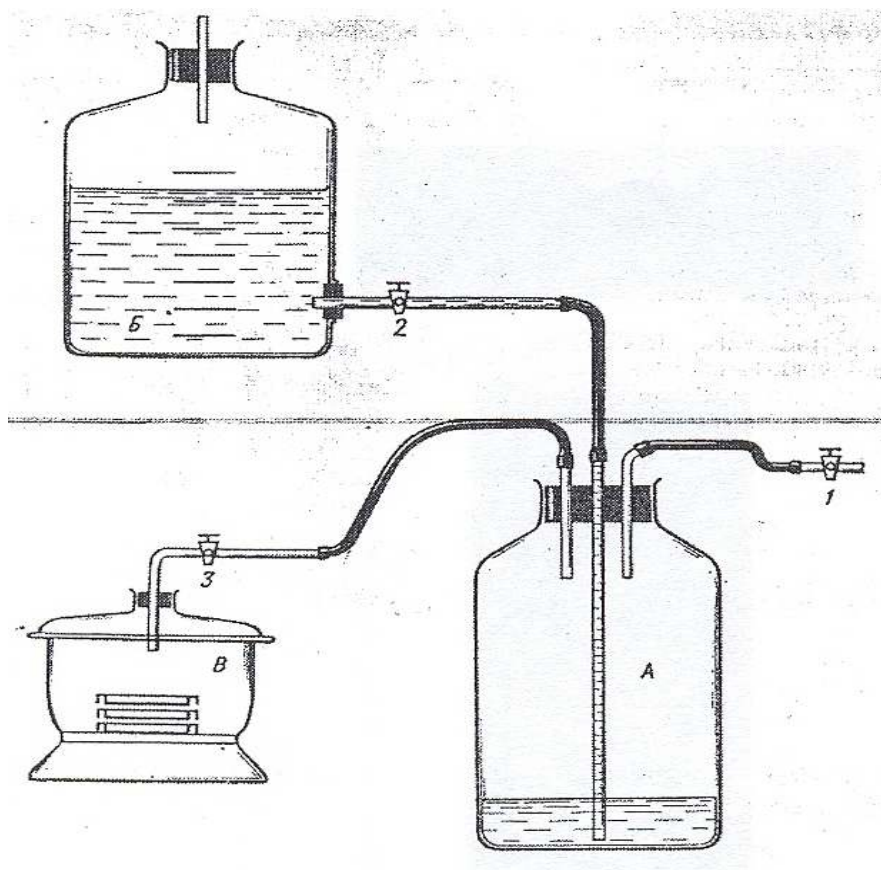


Рисунок 47. Газометр (А) и анаэростат (В)

В качестве поглотителя в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо и некоторые другие реактивы. При этом необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращивается культура. Например, на каждые 100 мл емкости используют 1 г пирогаллола и 10 мл 2,5 н. раствора гидроксида натрия.

Поскольку многие анаэробы нуждаются в углекислоте для биосинтеза веществ клетки, пирогаллол растворяют не в щелочи, а в насыщенном растворе бикарбоната натрия. Полноту поглощения кислорода химическими веществами контролируют, используя раствор, содержащий окислительно-восстановительный индикатор. Для приготовления раствора смешивают равные объемы 0,024%-ного раствора NaOH , 0,015%-ного водного раствора метиленового синего и 6%-ного раствора глюкозы; в качестве антисептика к раствору добавляют тимол. Перед употреблением в пробирку наливают 5 мл смеси и нагревают в кипящей водяной бане до обесцвечивания, быстро охлаждают и помещают в анаэроостат. В анаэробных условиях раствор остается бесцветным.

Удобен в обращении анаэроостат системы Газ Пак (Gas Pak), который снабжен палладиевым катализатором, поглощающим кислород, и химическими генераторами водорода (таблетка борогидрида натрия - NaNH_4) и углекислоты (таблетка бикарбоната натрия и лимонной кислоты). После загрузки анаэроостата таблетки смачивают водой и тотчас герметически закрывают его крышкой. В таком анаэроостате анаэробные условия создаются через 16-20 мин.

Культивирование в средах с восстановителями. Рост многих облигатных анаэробов возможен только в средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (Eh). Поэтому в среды для культивирования анаэробов рекомендуется добавлять восстановители, например, цистеин, тиогликолевую кислоту или ее натриевую соль, сульфид натрия (Na_2S), аскорбиновую кислоту или дитиотреитол. Чаще других используют сульфид и тиогликолат натрия. Обычно готовят 1 %-ные растворы этих

восстановителей в 5% -ном растворе бикарбоната натрия, стерилизуют автоклавированием и добавляют к средам сульфид Na из расчета 250-500 мг, а тиогликолат натрия от 250 мг до 1 г на 1 л среды. Восстановители следует использовать в концентрациях, не влияющих на рост микроорганизмов.

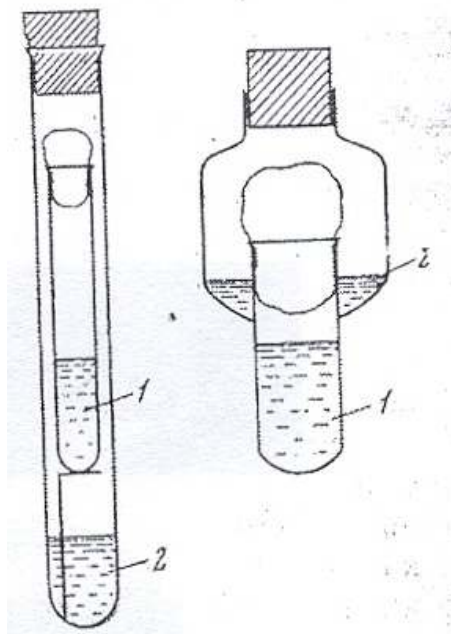


Рисунок 48. Сосуды для выращивания анаэробов: 1 – бактериальная культура, 2 – химический поглотитель молекулярного кислорода

Функции восстановителей выполняют и такие компоненты среды, как глюкоза и другие восстанавливающие сахара, а также пептон. С целью снижения окислительно-восстановительного потенциала к средам для культивирования анаэробов можно добавлять убитые клетки дрожжей, кусочки свежесрезанных тканей паренхиматозных органов животных (почки, печень, сердце) или растительных тканей (клубни картофеля, корнеплоды). Степень поглощения кислорода и соответственно степень восстановленности среды определяется окислительно-восстановительным потенциалом - E_h , который измеряют электрометрически на потенциометре или с помощью индикаторов таких, как резазурин, феносафранин и нейтральный красный, изменяющих окраску при изменении E_h . Особенно удобен резазурин, который добавляют к средам в концентрации 0,0001 % и стерилизуют вместе с минеральными компонентами среды. В окисленной форме он окрашен в слабо-розовый цвет, восстановленная форма его бесцветна. Резазурин регистрирует окислительно-восстановительный потенциал выше - 420 В. Феносафранин регистрирует более низкие значения потенциала - 252 В.

Успешному выращиванию облигатных анаэробов способствует внесение в среду большого количества посевного материала. Это объясняется тем, что при развитии анаэробов в культуральной жидкости накапливаются восстановители, которые связывают часть растворенного кислорода новой среды.

Некоторые экстремальные анаэробы, к которым относятся, например, метанобразующие бактерии и микроорганизмы рубца, погибают даже при кратковременном соприкосновении с кислородом воздуха. Работа с такими микроорганизмами представляет большие трудности и требует специального оборудования. Техника работы с экстремальными анаэробами была разработана Хангейтом. Она включает совокупность нескольких приемов, главными из которых являются следующие:

- среды перед употреблением кипятят для освобождения от растворенного кислорода;
- к средам обязательно добавляют восстановители - цистеин, сульфид Na, тиогликолат Na;
- пересевы, посевы, разлив сред в сосуды для культивирования осуществляют в токе углекислоты или водородуглекислотной смеси;
- культуры выращивают в герметически закрытых сосудах в атмосфере газовой смеси, часто с избыточным давлением;
- газы H_2 , CO_2 или их смеси используют только после очистки от следов кислорода.

В последнее время для культивирования экстремальных анаэробов предложены специальные камеры, которые содержат внутри все необходимое для выполнения бактериологических работ, включая термостат. Камера заполняется газовой смесью, состоящей из 10% H_2 , 10% CO_2 и 80% N_2 , освобожденной от примеси кислорода. Работу в камере исследователь проводит, надевая перчатки, вмонтированные в камеру. Это оборудование достаточно сложно и дорого, но оно имеет одно неоспоримое преимущество - контакт клеток микроорганизмов с воздухом исключается на всех этапах работы.

Температура

Интервалы температур, в которых возможен рост различных микроорганизмов, заметно варьируют. У мезофилов, к которым относится большинство известных нам форм, температурный оптимум лежит в интервале от 25 до 37°C. У термофилов он значительно выше - от 45 до 60-70°C. Психрофилы хорошо развиваются в интервале температур 5-10°C. Отклонения температуры от оптимальной неблагоприятно влияют на развитие микроорганизмов. Поэтому микроорганизмы выращиваются в термостатах (рис. 49) или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура. Мезофильные бактерии, естественным местом обитания которых является вода и почва, выращивают в интервале от 20 до 30°C, тогда как бактерии кожных покровов, слизистой или кишечника человека и животных культивируют при более высокой температуре – 35 – 37°C.

Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры.

Свет

Для роста подавляющего большинства микроорганизмов освещение не требуется. Напротив, прямые солнечные лучи отрицательно влияют на их развитие. Поэтому такие микроорганизмы выращивают в темноте. Свет необходим для роста фототрофных микроорганизмов. Однако естественное освещение используют редко, так как оно непостоянно и плохо контролируемо. Как правило, фототрофы выращивают в люминостатах, то есть в камерах, освещенных лампами накаливания или флуоресцентными лампами дневного света. Необходимая температура в люминостатах создается благодаря вентиляции или холодильному устройству.

Выбор источника освещения определяется спектром его излучения и длинами волн, при которых осуществляют фотосинтез культивируемые микроорганизмы. Для выращивания пурпурных и зелёных бактерий лучше использовать лампы накаливания; для культивирования микроводорослей и цианобактерий можно

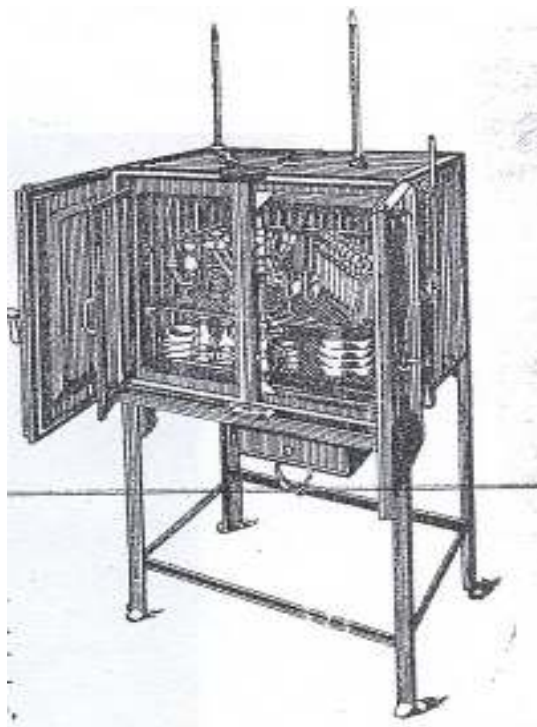


Рисунок 49. Термостат для культивирования микроорганизмов

применять флуоресцентные лампы дневного света. Помимо спектрального состава света обращают внимание на интенсивность освещения, которую измеряют с помощью люксметра Ю-16.

Вода

Рост и размножение микроорганизмов невозможны без присутствия в окружающей среде воды, причем вода должна находиться в доступной для клетки форме, т. е. в жидкой фазе. Однако в природных субстратах и питательных средах часть воды ассоциирована с молекулами растворенных веществ и не может быть использована микроорганизмами. Доступность воды в субстрате для развития микроорганизмов выражают величиной активности воды (a_w). $a_w = P/P_0$, где P – давление пара раствора (мм рт. ст.), P_0 – давление пара чистой воды (мм рт. ст.) при данной температуре. Значение a_w для дистиллированной воды равно 1,00. При растворении различных веществ в воде эта величина уменьшается и соответственно падает доступность для клетки воды.

Микроорганизмы могут расти на средах со значением a_w от 0,99 до 0,63. Потребности в доступной воде у бактерий, как правило, выше, чем у дрожжей и микроскопических грибов. Так, большинство бактерий, за

исключением галофилов, хорошо растет на средах с величиной a_w от 0,99 до 0,95, минимальная величина a_w , обеспечивающая рост дрожжей, лежит в пределах от 0,91 до 0,88.

Активность воды в среде можно определить по формуле $a_w = A/100$, где A - относительная влажность (%) атмосферы, которую измеряют при равновесии в закрытом сосуде, содержащем среду. Различную активность воды в питательной среде или субстрате создают добавлением к ним таких соединений, как NaCl, глюкоза, глицерин, полиэтиленгликоль, или уравниванием небольшого объема среды с большим объемом раствора H_2SO_4 или солей NaCl, KCl, KNO_3), имеющих определенную активность воды.

ГЛАВА 5

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиологию, биохимические свойства, циклы развития микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистыми культурами. Чистой, или аксенической, культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры - необходимое условие работы с микроорганизмами. Выделение чистой культуры обычно включает три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры.

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Накопительной называют такую культуру, в которой преобладают представители одной физиологической группы или даже одного вида микроорганизмов. Метод накопительных культур был введен в практику микробиологических исследований С. Н. Виноградским и М. Бейеринком. Сущность его заключается в создании элективных, т. е. избирательных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемых микроорганизмов или группы микроорганизмов из смешанной популяции.

При создании элективных условий необходимо знать физиологию или четко представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Элективные условия создают чаще всего, подбирая соответствующие среды, поскольку различные микроорганизмы для своего развития предъявляют неодинаковые требования к источникам питания. Например, микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот, могут расти в среде, из состава которой исключены связанные формы азота. Если внести в такую среду почву, то из громадного разнообразия имеющихся в ней микроорганизмов в первую очередь будут развиваться азотфиксаторы. Накопительные культуры автотрофных микроорганизмов получают на средах, где единственным источником углерода служит углекислота. Отсутствие в среде других соединений углерода задерживает развитие гетеротрофов. Такие специфические питательные среды, удовлетворяющие потребности преимущественно одной группы микроорганизмов, носят название элективных. В зарубежной литературе большее распространение получили термины

«накопительные» или «селективные» среды.

Накопительные культуры микроорганизмов, обладающих высокой требовательностью к составу питательных сред, получают иначе. При их выделении используется неодинаковая чувствительность клеток смешанной популяции к продуктам обмена веществ, накапливающимся в среде. Примером могут служить молочнокислые бактерии, для накопления которых используют солодовое сусло без мела, то есть среду, первоначально не обладающую элективностью. После внесения природного материала, содержащего молочнокислые бактерии, в среде вначале наряду с молочнокислыми бактериями хорошо развиваются представители родов *Enterobacter* и *Escherichia*. Однако по мере накопления в среде молочной кислоты и этилового спирта, образуемого гетероферментативными видами, условия для развития энтеробактерий и эшерихий постепенно ухудшаются, тогда как молочнокислые бактерии, которым свойственна высокая кислото- и спиртоустойчивость, продолжают расти. Таким образом, в результате развития молочнокислых бактерий среда приобретает необходимую степень элективности, что и обеспечивает получение накопительной культуры этих

бактерий. Другим примером могут служить уксуснокислые бактерии, которые характеризуются высокой устойчивостью к этиловому спирту. Накопление этих бактерий осуществляют на сусле, к которому добавляют 4-5% этанола.

Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций в среду включают антибиотики, которые отличаются специфичностью действия и позволяют избирательно подавить рост определенной группы микроорганизмов. Так, селективные условия для развития грамотрицательных бактерий можно создавать внесением в среду пенициллина в концентрации от 0,2 до 100 мг/л, поскольку многие виды грамположительных бактерий при этом или совсем не развиваются, или развиваются медленно. Чтобы создать благоприятные условия для развития бактерий и, напротив, подавить рост мицелиальных грибов, к средам рекомендуют добавлять нистатин в концентрации от 0,1 до 20 мг/л или гризеофульвин в концентрации от 1 до 20 мг/л.

При создании селективных условий следует учитывать неодинаковое отношение различных микроорганизмов к аэрации, температуре, кислотности среды и так далее. Поэтому при получении накопительной культуры аэробных микроорганизмов обеспечивают большую поверхность контакта среды с воздухом, напротив для обогащения среды анаэробными микроорганизмами тем или иным способом создают анаэробные условия. Культивирование при высокой температуре (50°C и выше) исключает развитие мезофильных микроорганизмов и обеспечивает рост термофилов. Селективным фактором может служить также неодинаковая скорость роста различных микроорганизмов при данной температуре. Например, на минеральной среде при освещении и температуре 35°C удастся почти полностью подавить рост зеленых водорослей и получить культуру, обогащенную цианобактериями.

При получении накопительных культур следует учитывать и такие особенности микроорганизмов, как способность к образованию эндоспор. Для накопления спорообразующих бактерий, среды инокулируют, как правило, субстратом, который предварительно пастеризуют, т. е.

кратковременно прогревают при высокой температуре (10 мин при 75°C или 2-5 мин при 80°C). Таким образом, можно полностью или почти полностью исключить развитие бактерий, не образующих споры.

Следует иметь в виду, что элективные условия далеко не всегда оптимальны для роста выделяемых микроорганизмов, однако они лучше переносятся ими, чем сопутствующими формами.

О получении накопительной культуры судят по появлению характерных признаков развития выделяемых микроорганизмов - помутнение среды, иногда сопровождаемое пигментацией, появление пленки, осадка, выделение газов. Помимо визуального наблюдения накопительную культуру микроскопируют и выявляют присутствие желаемых форм. Иногда необходимо определить продукты метаболизма, образование которых свойственно выделяемым микроорганизмам. Например, о развитии нитрифицирующих бактерий свидетельствует появление в среде нитрит- и нитрат-ионов и, напротив, уменьшение или даже полное исчезновение иона аммония.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

После того, как получена накопительная, приступают к выделению чистой культуры. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или из одной клетки.

Выделение чистой культуры из отдельной колонии

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Однако этот метод неприменим для выделения микроорганизмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. К числу таких микроорганизмов относятся некоторые бактерии, многие водоросли и простейшие.

При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной среды. Порядок работы следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. После того, как среда застынет, на ее поверхность из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и

стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю сначала по одной половине поверхности среды в чашке Петри, затем по второй половине, после чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во 2-й, 3-й и 4-й чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдают сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих - изолированные колонии (рис. 91). Рассевать накопительную культуру можно петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рис. 50. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки.

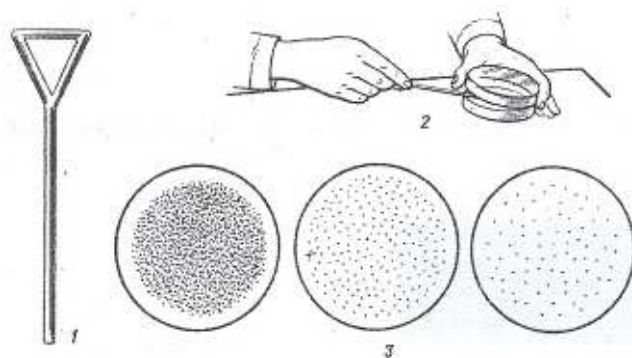
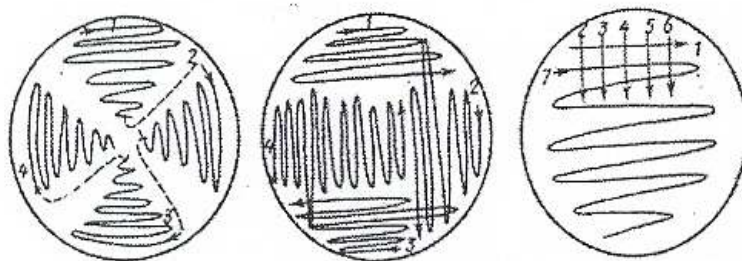


Рисунок 50. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем: 1 - шпатель Дригальского; 2 - рассев; 3 – рост микроорганизмов после посева

После посева чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1-7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирки или в жидкую среду.



*Рисунок 51. Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность
плотной среды петлёй*

Изолированные колонии аэротолерантных микроорганизмов и факультативных анаэробов чаще получают методом глубинного посева. Для этого плотную питательную среду предварительно разливают в пробирки по 15-20 мл и стерилизуют. Непосредственно перед посевом пробирки помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась. Высев проводят из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде. Разведения готовят с таким расчетом, чтобы при высеве 0,5-1,0 мл разведения получить изолированные колонии. Степень разведения определяется плотностью накопительной культуры. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48-50°C агаризованной средой вносят 0,5-1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Затем около пламени горелки вынимают из пробирки пробку, обжигая края пробирки в пламени горелки, и быстро выливают содержимое пробирки в чашку Петри. После того как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. Колонии, выросшие в толще среды, вырезают стерильным скальпелем или извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев проводят на поверхность среды в чашки Петри, но после посева чашки тотчас помещают в анаэроостат. Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведения накопительной культуры проводят в расплавленной и охлажденной до 45-50°C агаризованной питательной среде. Делают 6-10 последовательных разведений. Затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем стерильной смеси парафина и вазелинового масла (соотношение 3: 1), что препятствует проникновению воздуха в толщу агаризованной среды (рис. 52).

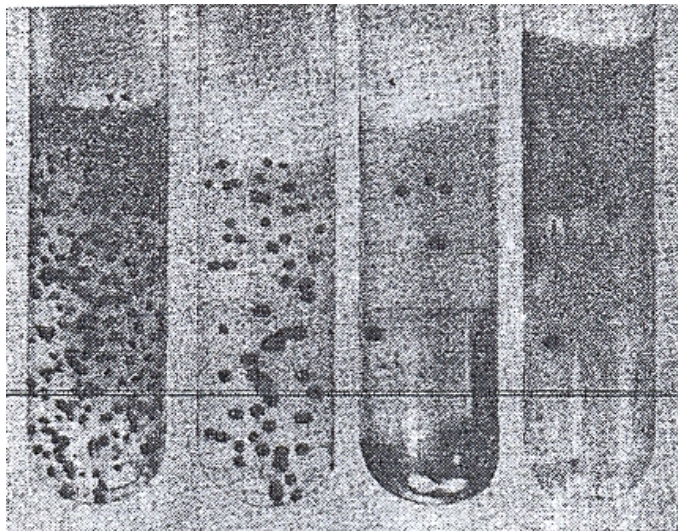


Рисунок 52. Изолированные колонии анаэробных бактерий, полученные методом разведения

Иногда агаризованную питательную среду после посева и тщательного перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри. Можно использовать капиллярные пипетки Пастера, в которые набирают соответствующее разведение накопительной культуры в расплавленной агаризованной питательной среде. Конец капилляра запаивают. При удачно выбранном разведении накопительной культуры в одной из пробирок (пипеток Пастера, трубок Бурри) вырастают изолированные колонии. Чтобы извлечь образовавшиеся колонии, поступают следующим образом. Удаляют стерильной иглой слой парафина и вазелинового масла, а столбик агаризованной среды осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская газ, не содержащий кислорода, через капилляр, который помещают между стенкой пробирки и агаризованной средой. Агаризованную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

Иногда плотную среду из пробирки извлекают иначе. Пробирку слегка нагревают, всё время быстро вращая ее над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика легко выскальзывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии, захватывая их стерильными капиллярными трубками или петлей. Можно также вырезать их стерильным ланцетом. Извлеченные колонии переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Если изолированные колонии получены в капилляре, то

после тщательной дезинфекции поверхности его разламывают стерильным пинцетом и участки капилляра, содержащие изолированные колонии, переносят в стерильную среду.

Для получения изолированных колоний методом глубинного посева и методом разведений рекомендуется использовать осветленные питательные среды.

Когда хотят получить изолированные колонии облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью

к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Сущность этого метода заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду заражают при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рис. 53).

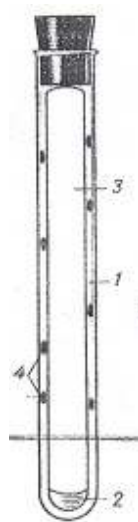


Рисунок 53. Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Хангейту): 1 – агаризованная питательная среда; 2 – конденсационная вода; 3 – смесь газов H_2 и CO_2 ; 4 – колонии бактерий

В некоторых случаях бывает достаточно одного посева в плотную среду, чтобы получить чистую культуру. Однако чаще посев в плотную питательную

среду повторяют два-три раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Выделение чистой культуры из одной клетки

Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом с помощью микроманипулятора или микроселектора.

Капельный метод Линднера используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, мицелиальными грибами, водорослями. Порядок работы следующий. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность стерильного покровного стекла стерильным стальным пером наносят ряд капель приготовленного разведения. Готовят препарат «висячая капля». Нанесенные на покровное стекло капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат помещают в термостат во влажную камеру, которой обычно служит чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне. Через 12-24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Те капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор (рис. 54) - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива, между которыми расположен обычный микроскоп. На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает

отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой.

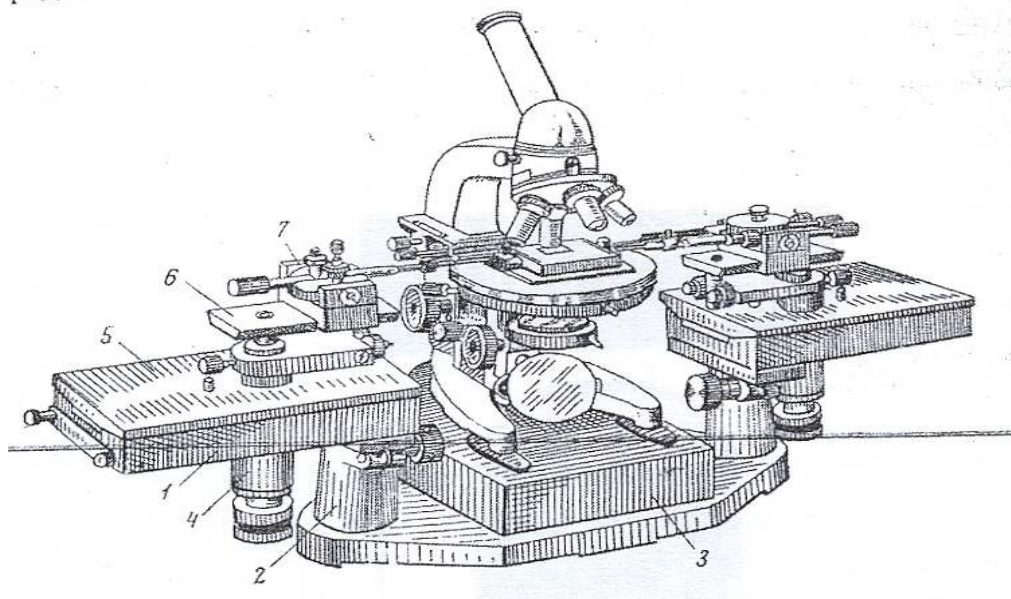


Рисунок 54. Микроманипулятор со скользящими плоскостями конструкции Рейнерта: 1 – нижняя пластина штатива, 2 – колонка, 3 – общая подставка для микроскопа и микроманипулятора, 4, 5 – скользящая пластина с рукояткой, 6 – штатив микроманипулятора для крепления держателя микроинструментов (7)

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбивают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду. Микроселектор Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ ВЫДЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРЫ

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. Это осуществляется обычно несколькими способами - визуальным, микроскопическим контролем и высевам на ряд питательных сред. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на

поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена. Такой контроль возможен только для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом. Для этого следует приготовить препарат фиксированных окрашенных клеток и просмотреть его с иммерсионной системой или препарат живых клеток и просмотреть его, используя фазово - контрастное устройство. Чистая культура многих микроорганизмов, как правило, морфологически однородна; допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых бактерий, например, микобактерий, нокардий и др., очень полиморфны, поэтому определение частоты таких культур при микроскопировании вызывает некоторые затруднения. Чистоту культур микроорганизмов обязательно проверяют высевам на питательные среды. Прежде всего выделенную культуру высевают на плотную среду, благоприятную для ее роста. Однородность выросших колоний - свидетельство чистоты культуры. Обязателен посев на мясо-пептонный агар - среду, которая обеспечивает рост многих хемогетеротрофов. Критерием чистоты культуры является однородность выросших колоний или, напротив, отсутствие роста, если данные микроорганизмы на мясо - пептонном агаре не развиваются. Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на МПА. Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофов, склонных развиваться с одним или несколькими спутниками. Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют высевам еще на ряд сред - сусло, мясо - пептонный бульон, картофельный агар и др. Набор сред и их состав определяются особенностями метаболизма выделенных микроорганизмов, а также их возможных спутников.

ЧАСТЬ 2

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЖИВЫХ КЛЕТОК

МИКРООРГАНИЗМОВ.

1.1. Цель работы: ознакомление с устройством микроскопа и приобретение навыков приготовления препаратов живых микроорганизмов.

1.2. Общие сведения

Микроскоп – это оптический прибор для получения увеличенных изображений очень малых предметов. Современными моделями биологического микроскопа являются микроскопы серии «Биолам».

Микроскоп состоит из оптической системы и механической части. Оптическая система предназначена для увеличения изображения предмета. Она включает увеличительную (объектив и окуляр) и осветительную (зеркало и конденсор с ирисовой диафрагмой и откидной линзой) системы.

Объектив представляет собой систему линз, заключенных в трубку. В микроскопах «Биолам» используются объективы с увеличением $\times 3$, $\times 5$, $\times 8$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 60$, $\times 85$, $\times 90$. Объективы малого увеличения применяют для предварительного просмотра препарата, объективы среднего увеличения ($\times 20$, $\times 40$, $\times 60$) – для изучения крупных клеток микроорганизмов, объективы большого увеличения ($\times 85$, $\times 90$) – иммерсионные- для изучения внутренних структур клеток. Объективы бывают сухие и погружные (иммерсионные). При работе с сухими объективами между фронтальной линзой объектива и объективом исследования находится воздух. Оптический расчет иммерсионных объективов предусматривает работу с ними при погружении фронтальной линзы объектива в однородную жидкую среду. При работе с сухим

объективом вследствие разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя.

При работе с иммерсионным объективом между покровным стеклом и линзами объектива помещают кедровое (касторовое) масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла. Лучи в оптически однородной гомогенной среде не меняют направления.

Окуляр служит для увеличения изображения, полученного от объектива. Окуляры обычно имеют увеличение $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Увеличение объектива и окуляра указано на их оправе.

Основными характеристиками объектива являются фокусное расстояние и разрешающая способность. Фокусное расстояние в отечественных микроскопах выражается в миллиметрах и, чем оно меньше, тем больше увеличение. Разрешающая способность объектива, то есть способность изображать мельчайшие детали препарата, определяется наименьшим расстоянием, при котором два близко расположенных штриха видны отдельно. Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличений окуляра и объектива.

Осветительное устройство состоит из зеркала и конденсора. Зеркало имеет плоскую и вогнутую отражающие поверхности. Обычно при работе зеркало повернуто к свету плоской стороной. Конденсор состоит из двух линз. Линзы собирают параллельные лучи света, отраженные от зеркала, в один пучок в плоскости исследуемого препарата. Конденсор укреплен на кронштейне и может передвигаться вверх и вниз с помощью рукоятки. На нижней части конденсора расположена ирисовая диафрагма, с помощью которой регулируют интенсивность освещения препарата.

Пучок лучей от источника света попадает на зеркало, отражается через диафрагму конденсора, проходит через нее, через исследуемый препарат и попадает в объектив. Объектив дает увеличенное изображение препарата в плоскости окуляра.

Механическая часть микроскопа состоит из основания и тубусодержателя, на котором укреплены предметный столик, кронштейн конденсора и зеркало. В верхней части расположены головка для насадки с окуляром и револьвер с

объективами. Предметный столик служит для закрепления на нем исследуемого препарата.

Фокусировка осуществляется при перемещении тубуса с помощью механизма, приводимого в движение двумя винтами – макрометрическим (грубая настройка) и микрометрическим (тонкая настройка). Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями. Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000х раз и более. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличение микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают 1400х. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений. Разрешающая способность микроскопа определяется главным образом объективом и конденсором.

1.3.Практическая часть.

1.3.1.Знакомство с правилами работы с микроскопом.

Сначала ставят объектив с малым увеличением (х8) и при этом увеличении устанавливают наилучшее освещение. Наилучшее освещение достигается при регулировке положения зеркала, конденсора и диафрагмы. При просмотре неокрашенных препаратов применяют суженную диафрагму и опущенный конденсор. При наблюдении окрашенных препаратов - открытую диафрагму и поднятый конденсор.

Затем помещают препарат на предметный столик микроскопа, под объектив, и укрепляют зажимами. Опускают объектив (х8) при помощи макрометрического винта почти до соприкосновения с предметным стеклом на расстояние около 0,5 см от предметного столика. Медленно вращают макровинт против часовой стрелки до появления четкого изображения препарата, после чего наводят резкость микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота макровинта. Повернув револьвер, устанавливают объектив со средним увеличением.

1.3.2.Исследование живых клеток микроорганизмов .

Препараты готовят на предметных стеклах толщиной 1,2 – 1,4 мм.

Существенным моментом является подготовка поверхности предметных стекол при изготовлении препаратов. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в капельки. Наиболее надежный способ обезжиривания – обработка стекол хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой и спиртом. В повседневной работе вполне достаточно бывает тщательно натереть сухое стекло мылом, после чего вытереть его чистой хлопчатобумажной тканью.

Живые клетки микроорганизмов исследуют методами «раздавленной» и «висячей» капли. Оба метода применяют для выявления подвижности клеток микроорганизмов, наблюдения за размножением, образованием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, характера их расположения и определения запасных веществ клетки.

В обоих случаях возможно окрашивание объекта «прижизненными» красителями - метиленовой синью или нейтральным красным в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

Препараты микроскопируют, слегка затемняя поле зрения, конденсор немного опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением – объектив х8, после того как обнаруживают край капли, устанавливают объектив х40.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, бактериологическая петля, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, пипетки, капельницы с водой, фильтровальная бумага.

1.3.2.1. Методика выполнения работы.

Методами «раздавленная» и «висячая» капля готовят препараты крупных микроорганизмов, например дрожжей и микроскопических грибов.

Для приготовления препарата «раздавленная» капля на чистое предметное стекло нанести каплю водопроводной воды. В нее внести культуру микроскопических плесневых грибов, взятую бактериологической петлей с поверхности плесневого хлеба, смешать с водой. Накрыть каплю покровным стеклом, так чтобы под ним не образовались пузырьки воздуха. Стеклойной

палочкой прижать покровное стекло к предметному и удалить избыток воды фильтровальной бумагой. Рассмотреть препарат под микроскопом.

Для микроскопирования дрожжей в химическом стакане с дистиллированной водой растворить щепотку прессованных дрожжей, помешивая стеклянной палочкой суспензию. Поместить суспензию в термостат или в водяную баню при температуре 30°C и выдержать 20 минут. На чистое предметное стекло нанести пипеткой каплю полученной дрожжевой суспензии и покровным стеклом накрыть смоченную поверхность, избыток воды убирают кусочком фильтровальной бумаги. Препарат рассматривают под микроскопом.

Препарат «висячая» капля применяют для длительных наблюдений за клетками микроорганизмов. На чистое покровное стекло нанести препаровальной иглой негустую суспензию микроорганизмов, выращенных в физиологическом растворе (0,5% раствор NaCl). Покровное стекло переворачивают и помещают на стерильное предметное стекло с лункой посередине так, чтобы капля свободно свисала над лункой. Для герметичности края лунки смазывают вазелином.

1.3.2.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму клеток дрожжей и микроскопических грибов, расположение клеток, строение грибницы и органов размножения грибов. Написать отчет о проделанной работе.

1.4. Контрольные вопросы.

1. Что изучает морфология микроорганизмов?
2. В чем отличие прокариотной клетки от эукариотной?
3. Какое строение имеет дрожжевая клетка?
4. Какими способами размножаются дрожжи?
5. В чем отличие культурных и диких дрожжей?
6. Как происходит размножение микроскопических мицелиальных грибов?
7. Назовите признаки характерные для грибов и общие с растениями и животными.

Рекомендуемая литература

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФИКСИРОВАННЫХ ОКРАШЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.

2.1. Цель работы: приобретение навыков приготовления фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов.

2.2. Общие сведения

Изучение морфологии микроорганизмов в окрашенном состоянии является наиболее распространенным в микробиологии методом. Этот метод позволяет изучить морфологические особенности клеток микроорганизмов и дает возможность найти различия между ними, а иногда – точно определить изучаемый микроорганизм. Кроме того, этот метод удобен в практической работе и легко доступен благодаря простоте техники окрашивания.

Приготовление окрашенного препарата включает приготовление мазка, фиксацию мазка и окрашивание препарата.

!. Приготовление мазка. Мазок должен быть тонким, так как при этом условии он удобен для изучения микробов. Мазок можно приготовить различными способами. На чистое обезжиренное предметное стекло, например, наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее исследуемый материал с помощью прокаленной бактериологической петли. Исследуемый материал слегка растирают в капле воды, а остаток культуры в петле сжигают в пламени горелки. Остудив петлю, приступают к изготовлению мазка: сначала краем петли культуру равномерно размешивают в капле, а затем круговыми равномерными движениями распределяют каплю на площади, составляющей примерно 1/3 предметного стекла. Затем мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или слабо нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки. Сильное нагревание препарата при сушке не рекомендуется, так как

белки коагулируют, искажая структуру и форму клеток. Высушенный препарат фиксируют.

2. Фиксация мазка. Под фиксацией подразумевают такую обработку живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в нем, сохранив тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к стеклу и лучше прокрашиваются. Фиксация нужна в случае работы с патогенными микроорганизмами для безопасности.

Существует несколько способов фиксации. Наиболее простым и самым распространенным в микробиологии является фиксация над пламенем горелки. В ряде случаев фиксация жаром оказывается слишком грубой. Тогда прибегают к фиксации препарата при помощи химических соединений. При этом фиксатор наливают на мазок или препарат погружают в сосуд с фиксирующей жидкостью на определенное время, а затем высушивают. Используют следующие фиксирующие жидкости: метиловый спирт (2-3 минуты), этиловый спирт (10-15 минут), ацетон (5 минут), смесь равных объемов этилового спирта и эфира - по Никифорову (15 минут). Можно применять для фиксации также хромовые соединения, формалин, пары осмиевой кислоты (несколько секунд).

3. Окрашивание препарата. При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. В зависимости от вида красителя и цели исследования продолжительность окрашивания меняется от 1 до 5 минут, в отдельных случаях до 3 минут и дольше. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют. Окрашивание препаратов микробов не является механическим процессом проникновения краски в микробную клетку. Механизм окраски следует рассматривать как процесс физико-химический. Соединение протопласта микробной клетки с красителем является в большинстве случаев весьма прочным, не поддается разрушению или простому вымыванию водой. В ряде случаев различные составные части клетки избирательно окрашиваются различными красящими растворами.

Для окрашивания микроорганизмов применяют кислые и основные красители. Первые вступают в реакцию с веществами основной, вторые - кислотной природы. Поскольку в белках есть основные группы (NH_2^+) и кислотные (COO^-) радикалы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми и другими красителями.

Из основных красителей наиболее часто в микробиологии применяют: красные – нейтральный красный, сафранин, фуксин, синие – метиленовая синь, фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, зеленые – метиленовый зеленый, малахитовый зеленый, коричневые – везувин, хризоидин, черные – индулин. Кислые красители могут быть следующие: красные и розовые – кислый фуксин, эритрозин, черные – нигрозин, желтые – конго, флуоресцин.

2.3.Практическая часть.

Существуют простые и дифференцированные способы окраски фиксированных препаратов микроорганизмов. При простой окраске используется какой либо один краситель, например метиленовый синий, фуксин, генциан фиолетовый в щелочных или карболовых растворах. Прокрашивается вся клетка.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы с растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки на 1 мл, спиртовки.

2.3.1. Методика выполнения работы.

Для изучения морфологии бактерий приготовить окрашенные фиксированные препараты из кефира, йогурта и мясопродуктов.

При приготовлении мазки из кефира и йогурта материал прокаленной петлей нанести на середину предметного стекла. К капле придвинуть под углом 45° другое предметное стекло. Тотчас же, плотно прижимая это стекло в том же положении под углом, продвинуть его налево по предметному стеклу с исследуемым материалом. Получается равномерно распределенный по поверхности стекла мазок. Мазок высушить на воздухе. Затем зафиксировать в пламени спиртовки. Препарат захватить пинцетом и три – четыре раза

медленно провести нижней стороной над пламенем (на границе светлой и темной его части). Окраску препарата провести с помощью метиленового синего. Количество краски должно покрыть всю поверхность мазка. Окраска проводится в течение 3 – 5 минут. По истечении срока окрашивания лишнюю краску слить с препарата и промыть его легкой струей водопроводной воды. Оставшуюся на стекле воду осторожно удалить фильтровальной бумагой. Окрашенный мазок должен быть абсолютно сухим.

При приготовлении препарата из мясопродуктов кусочек мяса, колбасы, печени осторожно захватить стерильным пинцетом и слегка надавить им на чистое предметное стекло, стараясь не сдвинуть в сторону (препарат «отпечаток»). Мазок высушить на воздухе и зафиксировать в пламени спиртовки также, как и в предыдущем случае. Окраску препарата провести с помощью фуксина. Количество краски должно покрыть всю поверхность мазка. Окраска проводится в течение 1 - 2 минут. По истечении срока окрашивания лишнюю краску слить и промыть препарат легкой струей водопроводной воды. Оставшуюся на стекле воду осторожно удалить фильтровальной бумагой.

Приготовленные препараты поместить на предметный столик микроскопа и, пользуясь объективом х8, установить свет. Затем в центр препарата на мазок нанести каплю иммерсионного масла и заменить сухую систему иммерсионной (объектив х90). С помощью макрометрического винта опустить тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Пользуясь микрометрическим винтом, поднять тубус и, наблюдая в окуляр, найти появление изображения. Если изображение нерезкое, тусклое или плывет, что-то сделано неправильно : загрязнена фронтальная линза объектива, мешают пузырьки воздуха в масле, случайно закрыта диафрагма, сдвинуто зеркало. Причину некачественного изображения необходимо устранить.

По окончании микроскопирования поднять тубус, снять препарат и осторожно протереть фронтальную линзу объектива сухой хлопчатобумажной салфеткой. Загрязнение фронтальной линзы объектива можно устранить протерев ее салфеткой смоченной очищенным бензином или ксилолом.

Погружать в иммерсионную жидкость можно только иммерсионные объективы (не сухие)!

2.3.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму и сочетание микробных клеток. Написать отчет о проделанной работе.

2.4. Контрольные вопросы.

1. Какую форму и размеры клеток могут иметь бактерии?
2. Какое строение имеет бактериальная клетка?
3. Как размножаются бактерии?

Рекомендуемая литература

[1] с.33-43, [2] с.18-41

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ И НЕГАТИВНЫЕ СПОСОБЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ.

3.1. Цель работы: приобретение навыков применения дифференцированных и негативных методов окраски препаратов микроорганизмов.

3.2. Общие сведения

Сложные или дифференцированные способы окраски микроорганизмов основаны на особенностях физико-химического строения клетки. Они применяются для детального изучения клеточных структур и для характеристики и дифференциации данного микроорганизма. При дифференциальной окраске применяют несколько красителей. Наибольшее практическое значение в микробиологической практике имеют окраска по Грамму и по Циль-Нильсену.

Красители делят на позитивные и негативные. Позитивные красители окрашивают клетки (при комнатной температуре в течение 30-60 секунд), негативные – пространство, окружающее микроорганизмы. В результате клетки выглядят силуэтами на фоне красителя.

Некоторые микроорганизмы (спирохеты) и отдельные структуры (внеклеточная слизь, капсулы), плохо выявляемые при помощи позитивных красителей, становятся хорошо заметными при окрашивании препаратов негативными красителями. Споры без соответствующей обработки не окрашиваются, поэтому при окрашивании бацилл позитивными красителями они окрашиваются как бы негативным способом и имеют вид преломляющих свет включений в вегетативных клетках.

3.3.Практическая часть.

3.3.1.Окраска микроорганизмов по Грамму.

Этот метод дифференциации микробных клеток основан на различии в химическом составе клеточных оболочек. Сущность его в том, что в клетках одних видов микроорганизмов образуется нерастворимое в спирте соединение йода с основным красителем. У других видов это соединение неустойчиво и после обработки спиртом растворяется. Микроорганизмы первой группы относят к грамположительным, а второй – к грамотрицательным. Окраска по Грамму является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий.

Как правило, по Грамму окрашиваются клетки молодых, чаще всего суточных культур, так как способность удерживать красители зависит от физиологического состояния бактерий.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы с растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки.

3.3.1. 1.Методика выполнения работы

На хорошо обезжиренное предметное стекло нанести тонкий мазок исследуемого материала (*Bacillus mesentericus*, *Lactococcus lactis*). Мазок высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем спиртовки и окрасить в

течение 1 минуты феноловым раствором генциана фиолетового (или кристаллического фиолетового), держа стекло в несколько наклонном положении. Слить краситель и, не промывая препарат водой, нанести на него раствор Люголя на 1 минуту (до полного почернения мазка). Стекло и в этом случае держать в наклонном положении. Слить раствор Люголя и, не промывая водой, обработать, непрерывно покачивая, 96% спиртом в течение 15 – 20 секунд. Время воздействия спирта очень существенно, так как при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат оказывается перекрашенным. Промыть водой препарат и окрасить фуксином Пфейфера в течение 1 минуты. Слить избыток краски и промыть водой. Высушить препарат фильтровальной бумагой и исследовать с иммерсионной системой. После этой обработки грамположительные микроорганизмы окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные приобретают розовую окраску.

3.3.1.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму и сочетание микробных клеток. Отметить грамположительные и грамотрицательные бактерии. Написать отчет о проделанной работе.

3.3.2. Выявление кислотоустойчивости у бактерий.

Кислотоустойчивость - свойство характерное для микобактерий, нокардий и некоторых актиномицетов. Оно связано с особенностями химического состава клеточных стенок, главным образом с наличием в них сложных липидов и миколовых кислот. Это свойство заключается в сохранении окраски клетками этих бактерий при обработке их кислотой.

Наибольшее распространение получил способ выявления кислотоустойчивости по Циль-Нильсену.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы с растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки, 5% раствор серной кислоты..

3.3.2. 1.Методика выполнения работы

На фиксированный приготовленный обычным способом мазок поместить полоску фильтровальной бумаги, обильно смочить бумагу карболовым фуксином Циля и нагреть препарат над пламенем 5 минут. Не допускать высыхания препарата, при необходимости в него добавить одну – две капли воды. Не доводить также краситель до кипения. Как только появятся пары, препарат отвести в сторону.

По окончании окрашивания и охлаждения препарата бумагу удалить, а мазок промыть слабой струей водопроводной воды до исчезновения краски в стоке. Затем препарат промокнуть фильтровальной бумагой и погрузить на 3 – 5 секунд в 5% раствор серной кислоты. Снова промыть водой, промокнуть бумагой и окрасить в течение 3 – 5 минут метиленовым синим Леффлера. Препарат тщательно промыть водой, высушить и исследовать с иммерсионной системой.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, а некислотоустойчивые – в синий.

3.3.2.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму и сочетание микробных клеток. Отметить кислотоустойчивые и некислотоустойчивые бактерии. Написать отчет о проделанной работе.

3.3.3. Негативный способ окраски препаратов.

При этом способе окраски исследуют микроорганизмы в неокрашенном виде, в то время как фон препарата окрашен каким-либо веществом, которое при приготовлении мазка распределяется на стекле вокруг микробных клеток. На окрашенном фоне микробные клетки выделяются ярко обрисованными контурами. Один из наиболее распространенных способов негативной окраски – способ Бурри.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы раствором черной туши, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки.

3.3.3. 1.Методика выполнения работы

Каплю туши поместить на хорошо обезжиренное предметное стекло , рядом с ней наносят каплю воды и в нее поместить прокаленной бактериологической петлей флору зубного налета. Обе капли быстро и тщательно перемешать . Из полученной смешанной капли приготовить мазок таким же способом, как из кефира и йогурта. Когда мазок высохнет, на него нанести каплю иммерсионного масла и рассмотреть с иммерсионной системой микроскопа. Микробные клетки обнаруживаются в виде ярко освещенных телец на темном фоне.

При негативном способе окраски микроорганизмы остаются в препаратах в живом виде (препарат не подвергается фиксации).

3.3.3.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради форму и сочетание микробных клеток. Написать отчет о проделанной работе.

3.4. Контрольные вопросы.

1. В каких случаях применяют дифференцированные способы окраски бактерий?
2. Чем отличается строение и состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий?
3. Какие свойства бактерий связывают с их принадлежностью к группам грамотрицательных и грамположительных?
4. На чем основан способ негативной окраски микроорганизмов?

Рекомендуемая литература

[1] с.44-61, [2] с.62-71.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУР И ВКЛЮЧЕНИЙ В КЛЕТКАХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

- 4.1. **Цель работы:** приобретение навыков выявления некоторых структур и включений в клетках микроорганизмов.

4.2. Общие сведения

Клетки многих микроорганизмов могут быть окружены капсулой или слизью. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток. Для выявления капсул применяют способ негативной окраски с помощью жидкой туши.

Многие микроорганизмы в определенных условиях образуют запасные вещества, которые обнаруживаются в клетке в виде гранулярных цитоплазматических включений. Природа запасных веществ различна. Чаще всего это полисахариды, липиды, полифосфаты. Некоторые бактерии накапливают в клетках серу. Запасные вещества выявляются в клетках разного возраста, используя те или иные микрохимические реакции.

Споры бактерий по сравнению с вегетативными клетками обладают более высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды. Они представляют собой округлее, овальные или эллипсоидные образования. Споры кислотоустойчивы, поэтому с трудом окрашиваются красителями. Объясняется это большой плотностью оболочки, низкой концентрацией свободной воды в ней и высоким содержанием липидов в спорах. В препаратах окрашенных простыми способами или по Грамму, споры остаются бесцветными. В случае выявления у микроорганизма способности к спорообразованию необходимо обратить внимание на тип спорообразования, расположение споры в клетке, форму свободных спор и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2 – 3 суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения на фоне споры.

4.3.Практическая часть

4.3.1. Окраска включений клеток микроорганизмов.

Запасные вещества в клетках микроорганизмов (включения) могут быть представлены гранулами полисахаридов. В клетках дрожжей накапливаются включения гликогена. Для обогащения дрожжевых клеток гликогеном их выращивают на солодовой среде. Углевод гранулеза (крахмалоподобное вещество) накапливается в клетках маслянокислых бактерий. Объектом исследования может служить накопительная культура маслянокислых бактерий. Ее получают следующим образом на трое-четверо суток до занятия в пробирки помещают мелко нарезанный неочищенный картофель (1/3 пробирки), на кончике ножа вносят мел и доливают до верха водопроводной водой. Пробирки помещают на водяную баню при 70° С нагревают 10 минут, затем охлаждают и ставят в термостат при 30° С.

Запасное вещество микроорганизмов может быть представлено также полифосфатами – валютинном. Валютин представляет собой запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. Характерное его свойство – сродство к основным красителям и метакромазия, то есть способность приобретать иной цвет, чем цвет окрашиваемого вещества. В клетках прокариот валютин локализован в цитоплазме, в клетках эукариот – в вакуолях.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки, 1% раствор серной кислоты.

4.3.1. 1.Методика выполнения работы

Окраска гранул. К капле суспензии дрожжей на предметном стекле добавить каплю раствора Люголя. Препарат покрыть покровным стеклом и микроскопировать с сухими объективами х8, х40. Гранулы крахмалоподобных веществ окрашиваются в синий цвет, а гранулы гликогеноподобных – в красновато-коричневый.

Окраска валютина и метакроматина.

Для выявления валютина у дрожжей применяют следующий способ. Фиксированный в пламени спиртовки мазок окрасить метиленовым синим в течение 3 минут. Краситель слить, препарат промыть водой и не высушивая, нанести на мазок небольшую каплю 1% раствора серной кислоты. Мазок покрыть покровным стеклом и микроскопировать с сухими объективами х8, х40.

Для выявления валютина у бактерий используют метод Омелянского. Приготовить тонкий мазок клеток, высушить его на воздухе, зафиксировать в пламени спиртовки. На фиксированный мазок налить карболовый фуксин и окрашивать клетки в течение 1 минуты. Краску слить, промыть препарат водой и обесцветить 1% раствором серной кислоты в течение 20 – 30 секунд. Затем кислоту слить, препарат промыть водой и дополнительно окрасить 30 секунд метиленовым синим. Снова промыть водой, высушить и микроскопировать с иммерсионной системой. Гранулы валютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы.

4.3.1.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради включения полисахаридов и валютина в микробных клетках. Написать отчет о проделанной работе.

4.3.2. Окраска спор у бактерий.

В связи с особенностями физико-химического состава и плотной малопроницаемой оболочки для окраски спор применяют сначала химические вещества, меняющие структуру оболочки. Однако при последующем прокрашивании споры одновременно прокрашивается и цитоплазма клетки, поэтому под микроскопом последняя выглядит однородно окрашенной. Чтобы добиться прокрашки только споры, следует такой «перекрашенный» препарат частично обесцветить, отнимая краситель у цитоплазмы и оставляя его в споре. Это легко достигается, так как краситель, адсорбированный спорой, удерживается прочнее, чем адсорбированный цитоплазмой клетки. Поэтому все способы окраски спор основаны на едином принципе. Сначала споры протравливают разными веществами (хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, едким натром или перекисью водорода), затем

окрашивают клетку со спорой при нагревании и обесцвечивают цитоплазму, а потом дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, капельница с водой, капельницы растворами красителей, иммерсионное масло, стерильные пипетки, спиртовки, 1% раствор серной кислоты, 5% раствор хромовой кислоты.

4.3.2. 1.Методика выполнения работы

Метод Циля-Нильсена в модификации Мюллера. До фиксации мазка на пламени препарат готовят обычным способом. Далее на фиксированный и остывший препарат нанести 5% раствор хромовой кислоты. Через 5 – 10 минут кислоту смыть водой. Препарат покрыть полоской фильтровальной бумаги, обильно смочить бумагу карболовым фуксином Циля. Подогреть препарат в пламени спиртовки до появления паров (не до кипения), отвести в сторону и добавить новую порцию красителя. Так в течение 7 минут. При этом важно, чтобы краситель испарялся, но бумага не подсыхала. После охлаждения бумагу снять, препарат промыть водой и тщательно промокнуть фильтровальной бумагой. Далее провести обесцвечивание цитоплазмы клеток, обработать препарат 1% раствором соляной или серной кислоты 16 -18 секунд для бактерий *Bacillus mesentericus*. При превышении этого времени может обесцветиться и спора.

4.3.1.2. Оформление работы.

Рассмотреть под микроскопом и зарисовать в тетради споры бактерий. Написать отчет о проделанной работе.

4.3. Контрольные вопросы.

1. Как происходит образование спор у бактерий?
2. Чем вызвано образование спор у бактерий?
3. Какие типы спорообразования вам известны?

Рекомендуемая литература

[1] с.44-61,[2] с.62-71

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

5.1 Цель работы: приобретение навыков приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов.

5.2. Общие сведения

При составлении питательных сред необходимо учитывать потребность микроорганизмов в элементах питания. По составу среды подразделяют на естественные (натуральные) и синтетические.

Состав натуральных сред очень сложен и непостоянен, существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Синтетические среды содержат в своем составе известные химически чистые вещества в строго указанных концентрациях. Синтетические среды широко используются для исследований, связанных с изучением обмена веществ микроорганизмов.

Существуют также полусинтетические среды, относящиеся к средам с неопределенным химическим составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Эти среды широко используются в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

5.3. Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда: йодный раствор (1 г йодистого калия растворить в 5 мл воды, к полученному раствору добавить 1 г йода и довести объем смеси дистиллированной водой до 300 мл), колбы для приготовления сред, стеклянные палочки, набор минеральных солей, глюкоза, пептон, желчь,

водяная баня, весы, шпатель, термометр, фарфоровая чашка, пипетка, сахариметр, бумажные фильтры, агар-агар, полотно, вата.

5.3.1.Методика выполнения работы

Приготовление картофельной среды. Нарезать в химический стакан на 150 мл ломтиками 20 г очищенного, промытого водой картофеля, залить 100 мл водопроводной воды, варить 30 минут. Отвар фильтровать через бумажный фильтр и добавить воду до первоначального объема. К полученной жидкости добавить 2 г агар-агара, кипятить до его растворения и установить нейтральную реакцию среды (рН 7). Среду стерилизуют 20 минут при 1 атм.

Приготовление сусла. Зерно ячменя замочить в холодной воде и прорастить при 35°C . После того, как ростки станут вдвое больше, чем длина зерна, зерно высушивают до воздушно-сухого состояния и получают солод. Для приготовления сусла солод крупно размалывают и 250 г его берут на 1 л воды. Для лучшего выделения фермента амилазы смесь подогревают при 57°C до прекращения окрашивания раствора при добавлении йодного раствора (йодная проба на содержание крахмала). Пробы на содержание крахмала проводят в фарфоровой чашке в капле жидкости.

Сусло процедить через полотно, полученный фильтрат нагреть до кипения и кипятить 5 – 10 минут, затем фильтровать через бумажный фильтр. Такое сусло содержит 10 – 20% сахара. Точное его содержание определяют по плотности раствора при помощи сахариметра. Сусло разбавить водой до концентрации сахара 6 – 8% и стерилизовать при 115°C и давлении 0,5 атм. 30 минут.

Приготовление сусло-агара. К приготовленному суслу добавить 2% агара, кипятить до расплавления агара, фильтровать через полотно и стерилизовать таким же способом, как сусло.

Приготовление молочно-солевого агара. Мерным цилиндром отмерить 100 мл 2% стерильного агара, содержащего 6,5% хлорида натрия. Добавить к нему 10 мл обезжиренного стерильного молока.

Приготовление среды Кесслера. Отмерить 1 л водопроводной воды, прибавить 10 г пептона и 50 мл желчи. Смесь прокипятить при помешивании в течение 20 – 30 минут на водяной бане. Затем профильтровать через слой ваты.

В полученном фильтрате растворить 2,5 г глюкозы и довести объем до 1 л, рН среды довести до значения 7,4 – 7,6. Добавить 2 мл 1% водного раствора кристаллического фиолетового. Среду разлить в пробирки с поплавками и стерилизовать при давлении 0,1 атм. В течение 10 минут. Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет.

Приготовление дрожжевых сред.

Дрожжевой экстракт. 100 г прессованных дрожжей развести в 100 мл воды, смесь кипятить 1 ч, трижды фильтровать через бумажный фильтр и стерилизовать 30 минут при 115°C.

Дрожжевая вода. 5 г сухих дрожжей размешать в 100 мл воды, кипятить 10 минут, фильтровать через бумажный фильтр и стерилизовать по 30 минут текущим паром ежедневно в течение 3 суток.

Приготовление среды Чапека. Взять навески 2 г глюкозы, 0,2 г NaNO_3 , 0,1 г K_2HPO_4 , 0,05 г MgSO_4 , 0,05 г KCl , 0,01 г FeSO_4 , вода дистиллированная 100 мл.

5.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

5.4. Контрольные вопросы.

1. Что такое питательная среда и для чего она предназначена?
2. На какие группы делятся питательные среды?
3. На какие группы делятся микроорганизмы в зависимости от типа питания?
4. Как питательные вещества попадают в клетку?

Рекомендуемая литература

[1]с.61-75,[2]с.106-114

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.

6.1. Цель работы: приобретение навыков культивирования микроорганизмов.

6.2. Общие сведения

С.Н. Виноградским в практику микробиологии введены элективные (избирательные) среды, предназначенные для определенных групп микроорганизмов. Такие среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодны или совсем непригодны для развития других.

Зная физиологические особенности соответствующей группы микробов, можно подобрать такие условия культивирования (состав, активную кислотность среды, условия аэрации, температуру и так далее), при которых будут развиваться лишь представители данной группы. Элективные среды позволяют вести биологические процессы в лаборатории и на производстве без предварительной стерилизации среды. Эти среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания и получения накопительных культур. Понятие «элективные среды» входит в более широкое понятие «элективные условия».

Дифференциально-диагностические среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Примером индикаторной среды для выявления бактерий из группы кишечной палочки в естественных субстратах может служить агаризованная среда Эндо.

6.3. Практическая часть

Среда Эндо имеет следующий состав, г: пептон – 10, лактоза – 10, K_2HPO_4 – 3,5, $NaHSO_3$ – 2,5, агар – 150, вода дистиллированная – 1000, pH 7,4. К среде добавляется 4 мл 10% спиртового раствора основного фуксина. Бактерии из рода *Escherichia* на этой среде образуют малиновые колонии с металлическим блеском.

При определении видовой принадлежности бактерий используют pH-индикаторные среды, в состав которых входит один из индикаторов – нейтральный красный (0,0005%), феноловый красный (0,005%), бромтимоловый синий (0,0005%). Если развитие микроорганизма сопровождается образованием кислоты или щелочи, цвет индикатора изменяется. Дифференциально-диагностические среды особенно широко

применяют в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

Приборы, реактивы, посуда: колбы для приготовления сред, химические стаканы на 100 мл, стеклянные шпатель, термометр, пипетка, бумажные фильтры, набор минеральных солей, глюкоза, среда Эндо в порошке, бактериологические петли.

6.3.1.Методика выполнения работы

Приготовление глюкозо-аммонийной среды для культивирования дрожжей. В колбе на 100 мл приготовить среду следующего состава, г: глюкоза – 2,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5, KH_2PO_4 – 0,08, K_2HPO_4 – 0,02, MgSO_4 – 0,05, NaCl – 0,01, CaCl_2 – 0,01, вода водопроводная – 100 мл.

Приготовление среды Эндо. Среду приготовить в химическом стакане на 100 мл по прописи указанной на этикетке. После охлаждения среды до 50°C разлить в чашки Петри.

После приготовления питательных сред произвести посев микроорганизмов на эти среды.

Посев на плотные среды. Самым частым методом посева культуры микроорганизмов является посев на чашку Петри с агаризованной средой.

Посев культуры осуществляется одним из трех способов:

- посев чертой – проводят петлю по прямой линии по середине питательной среды,
- посев штрихом – проводят зигзагообразную линию скользя петлей по поверхности среды от одного края чашки Петри к другому,
- сплошной посев – растирают материал непрерывными круговыми движениями по всей поверхности питательной среды.

Посев проводят непосредственно около зажженной горелки, в пламени которой стерилизуется петля. Быстро переносят петлю с взятым материалом в чашку Петри с питательной средой приоткрыв крышку. Затем закрывают крышку чашки Петри, а петлю тщательно прокаливают на пламени и ставят в штатив. Записанную чашку Петри подписывают, указав название посевного материала и дату посева. После этого ставят чашку Петри в термостат крышкой вниз.

При посеве на плотные среды нужно следить, чтобы не поцарапать среду петлей.

Техника посева на жидкие среды в основном такая же. Отличительные особенности посева на жидкие среды:

- недопустимо, чтобы жидкость питательной среды выливалась при горизонтальном положении пробирки,
- нужно следить, чтобы жидкость не смачивала краев пробирок и ватных пробок,
- при посеве жидкого материала можно пользоваться петлей или стерильной пипеткой.

6.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

6.4. Контрольные вопросы.

1. Что такое элективные питательные среды?
2. Для чего предназначены дифференциально-диагностические и элективные среды?
3. Каким образом можно создать элективные условия для культивирования микроорганизмов?

Рекомендуемая литература

[1] с.61-75, [2] с.106-114

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ.

7.1. Цель работы: приобретение навыков получения накопительной культуры микроорганизмов.

7.2. Общие сведения

При изучении физиолого-биохимических особенностей и цикла развития микроорганизмов, а также для установления их видовой принадлежности необходимо работать с чистой культурой микробов.

Выделение чистой культуры включает три этапа: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры, определение ее чистоты.

Для получения накопительной культуры определенного вида бактерий сначала подбирают элективные условия среды, предложенные Виноградским С.Н., обеспечивающие преимущественное развитие данных бактерий. Затем из мест обитания, в которых преобладают представители данной группы, делают посев на соответствующую элективную среду.

7.3. Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда: колбы для приготовления сред, химические стаканы на 100 мл, стеклянные шпатель, термометр, набор минеральных солей, глюкоза, пробирки.

7.3.1. Методика выполнения работы

Приготовить среды для получения накопительных культур:

1. среда для анаэробов (среда Виноградского). Состав среды, г глюкоза - 0,2, K_2HPO_4 - 0,1, $MgSO_4$ - 0,05, NaCl - 0,05, $MnSO_4$, $FeSO_4$ - следы, $CaCO_3$ - 2,0, вода - 100 мл. Среду налить в пробирки, закрыть ватными пробками, внести небольшое количество почвы и пастеризовать 10 минут при температуре 80°C. Затем поставить пробирки в термостат при температуре культивирования 30°C.

2. накопительная культура аэробных спорообразующих бактерий. Нарезать клубень картофеля на мелкие ломтики, поместить их в колбу, добавить на кончике шпателя мел, залить небольшим количеством воды, закрыть ватной пробкой и прогреть на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Вегетативные клетки и споры большинства бактерий, находящихся на поверхности клубней картофеля погибнут. Жизнеспособными останутся только споры бактерий *Bacillus*. Температура культивирования 30°C.

7.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

7.3. Контрольные вопросы.

1. Что такое накопительная культура?
2. В чем заключается сущность метода накопительных культур?
3. Какие особенности микроорганизмов учитывают при получении накопительных культур?
4. По каким признакам судят о получении накопительной культуры?

Рекомендуемая литература

[1] с.61-75, [2] с.106-114

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ МИКРООРГАНИЗМОВ.

8.1. Цель работы: приобретение навыков обнаружения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов.

8.2. Общие сведения

При изучении физиолого-биохимических признаков микроорганизмов исследуют: отношение их к источникам углерода и азота, продукты жизнедеятельности, накапливающиеся в среде (кислоты, спирты, газы), отношение к кислороду, щелочам и другим факторам внешней среды, способность продуцировать антибиотические вещества, в ряде случаев определяют чувствительность микроорганизмов к тем или иным антибиотикам.

Для обнаружения физиолого-биохимических свойств бактерий пользуются посевом их на дифференциально-диагностические среды (жидкие и плотные), содержащие вещества, в отношении которых микробы способны проявлять свою химическую (ферментативную) активность. Результат реакции определяется при помощи добавляемых в питательную среду различных индикаторов, дающих в большинстве случаев цветные реакции. Поэтому метод посева на дифференциально-диагностические среды получил название посева на «пестрый ряд».

8.3. Практическая часть

При использовании микроорганизмами источников углерода, в частности углеводов, продуктами их жизнедеятельности нередко бывают газы, кислоты и спирты. Для обнаружения газов применяют посев уколом в агаровую среду в пробирки. При появлении газов столбик агар-агара разрывается. Используют также жидкую среду с перевернутыми вверх дном поплавками. Поплавок представляет собой небольшую узкую пробирку (0,5×3-4 см). Его опускают вверх дном в обычную пробирку с жидкой средой, которая при стерилизации заполняет поплавок. При развитии микроорганизмов, образующих газы, последние вытесняют жидкость из поплавка.

Образование кислот при посеве на средах, содержащих углеводы, устанавливают при помощи индикатора бромтимолблау, а их количество – по титрованию 0,1 н. раствором щелочи. При наличии мела кислоты связываются в кальциевые соли, которые можно обнаружить добавлением к 5 мл среды 1 мл концентрированного раствора оксалата аммония. В присутствии кислот (например, уксусной) выпадает белый осадок.

Образование спирта определяют при отгоне части субстрата с последующей пробой на спирт (реакция на появление йодоформа).

Продуктами жизнедеятельности микроорганизмов на доступных источниках азота часто бывают : аммиак (проба с реактивом Несслера), сероводород и меркаптан (проба с фильтровальной бумагой, смоченной ацетатом свинца), индол (проба с азотистой кислотой), нитрит (проба с цинк-йод-крахмалом в кислой среде). Редуктазную способность культур выявляют обесцвечиванием метиленового синего.

Приборы, реактивы, посуда: колбы для приготовления сред, химические стаканы на 100 мл, стеклянные шпатель, термометр, набор минеральных солей, глюкоза, пробирки.

8.3.1.Методика выполнения работы

Изучение сбраживания углеводов. Способность разлагать различные виды углеводов с образованием альдегидов, кислот и газообразных продуктов (CO_2 , H_2 , CH_4) обнаруживается при посеве на жидкие питательные среды Гиса с

различными углеводами и реактивом Андрее или лакмусовой настойкой в качестве индикатора.

Приготовить среды Гиса с различными углеводами (лактозой, глюкозой, мальтозой, манитом), как указано в прописи на этикетках сред. Среда разлить в четыре пробирки. После остывания сред произвести в них посева молочнокислых, спорообразующих бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Микроорганизмы культивировать в термостате при температуре 30°C.

8.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

8.4. Контрольные вопросы

1. Какие свойства микроорганизмов исследуют при изучении их физиолого-биохимических свойств?
2. На каких средах изучают способность микроорганизмов к сбраживанию углеводов?
3. Какие продукты гниения вы знаете? Как проводят обнаружение этих продуктов?

Рекомендуемая литература

[1] с.90-104, [2] с.118-123

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ.

9.1. Цель работы: приобретение навыков выделения чистой культуры микроорганизмов.

9.2. Общие сведения

Чистой культурой микроорганизмов называют такую культуру, которая получена из одной клетки и содержит микробы одного вида.

Для выделения чистых культур аэробных бактерий делают высева на чашки Петри из накопительной культуры. Ее каплю (лучше из соответствующего разведения) наносят и осторожно распределяют стерильным стеклянным

шпателем по поверхности плотной среды, после чего этим же шпателем протирают поверхность последующих трех- четырех чашек. Чашки выдерживают от двух до семи суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Выросшие изолированные колонии отсевают петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды или в жидкую среду.

Высев из накопительной культуры микроорганизмов, относящихся к факультативным анаэробам для получения изолированных колоний делают методом глубинного посева в пробирки со столбиком стерильного агара. Стерильной иглой берут чистую культуру из колоний, одновременно вынимают пробку, обжигают края пробирки, держа ее вверх дном, и иглой над горелкой делают прокол до дна. Выделение чистой культуры анаэробных бактерий по методу Коха возможно только при ограничении доступа кислорода.

9.3. Практическая часть

После того, как получена накопительная культура, приступают к выделению чистой культуры. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии и из одной клетки.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, предметные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, набор красителей, МПА, чашки Петри.

9.3.1.Методика выполнения работы

1. Убедиться в получении накопительных культур микроорганизмов. О получении накопительных культур свидетельствуют :

- Для анаэробных микроорганизмов – помутнение среды, газовыделение, запах масляной кислоты.
- Для споровых аэробных бактерий – появление на поверхности среды морщинистой пленки.

2. Просмотреть под микроскопом материал из накопительных культур:

- В культуре анаэробных микроорганизмов (*Clostridium*) выявить гранулезу в клетках,
- В культуре споровых аэробных бактерий обнаружить споры.

3. Получить изолированные колонии споровых аэробных бактерий (*Bacillus mesentericus*). Для этого взять прокаленной петлей материал из бактериальной пленки, перенести его в пробирку со стерильной водой и тщательно перемешать. Из полученной суспензии провести рассев петлей на поверхности МПА в чашке Петри методом «истощающего штриха». Чашки Петри поместить в термостат при температуре 30°C.

9.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

9.4. Контрольные вопросы

1. Какие вам известны способы выделения чистых культур?
2. В чем заключается метод Коха?
3. Чем отличается методика выделения чистых культур аэробных микроорганизмов от методики выделения факультативных анаэробов?
4. Каким образом выделяют чистую культуру из одной клетки?

Рекомендуемая литература

[1] с.61-75, [2] с.106-114

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ МИКРООРГАНИЗМОВ.

10.1. Цель работы: приобретение навыков обнаружения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов.

10.2. Общие сведения

Микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов самые различные соединения полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и другие. Однако макромолекулы не могут проникнуть через мембрану клеток. Они подвергаются гидролизу, который осуществляется под действием ферментов гидролитического действия. Большинство из них катализирует гидролиз полимеров до растворимых продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических

транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди представителей различных групп микроорганизмов. При поиске продуцентов ферментов гидролаз в лабораторной практике используют специальные методы, сущность их состоит в том, что при выращивании микроорганизмов в агаризованной среде, содержащей макромолекулярный субстрат, в случае выделения в среду экзоферментов, гидролизующих данное соединение, выросшие колонии окружены зоной, в которой обнаруживаются продукты гидролиза.

10.3. Практическая часть

Среди биохимических свойств культуры наиболее важным является определение ее ферментативной активности. Активность протеаз устанавливают, во-первых, по разжижению желатина, учитывая скорость и характер разжижения при уколе столбика желатина, во-вторых, по свертыванию и пептонизации молока, то есть отмечают кислотность по покраснению синей лакмусовой бумажки, образование устойчивого сгустка и коагуляцию с последующей пептонизацией, пептонизацию без предварительного свертывания, а также скорость происходящих изменений.

Активность амилазы определяют по величине зоны гидролиза крахмала, для этого делают пробы с раствором Люголя. Активность целлюлазы устанавливают по степени распада целлюлозы на среде Гетчинсона, активность сахаразы – по гидролизу сахарозы при действии реактива Фелинга, который окисляет альдегидные соединения, при этом оксид меди переходит в закись.

Приборы, реактивы, посуда: бактериологическая петля, фильтровальная бумага, МПА, желатин, молоко, агар. штатив с пробирками, водяная баня, крахмал, молоко.

10.3.1.Методика выполнения работы

1. Амилолитическая активность. Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, активными продуцентами которых являются различные виды бацилл, псевдомонад, стрептомицетов и мицелиальных грибов. Для выявления амилолитической активности используют среду следующего состава (г/л): пептон - 1,0; KH_2PO_4 - 0,5; растворимый крахмал - 0,2; агар - 1,5; pH среды - 6,8-7,0.

Среды залить в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет, исследуемые бактерии высевать штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз крахмала

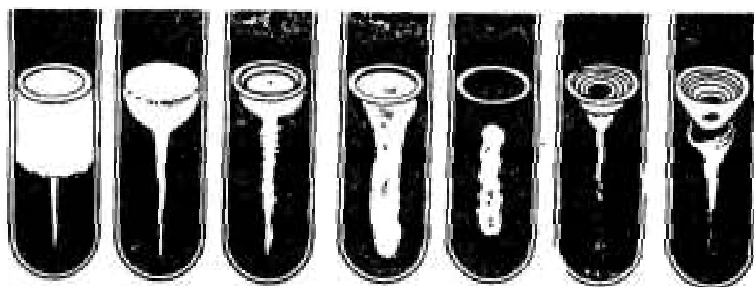
обнаруживают после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Для этого на поверхность среды налить 3 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизировался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измерить в мм от края штриха (колонии) до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилалитическая активность.

2. Протеолитическая активность. Протеолитические ферменты (протеазы) катализируют расщепление белков на фрагменты: поли- и олигопептиды. Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов мицелиальных грибов и других групп микроорганизмов. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатин, казеин и другие белки.

а) Протеолиз желатина. Культуру высеивают на мясопептонную желатину (МПЖ). Среду готовят следующим образом: к 30 мл МПБ добавляют 3,0 г желатина, оставляют на 20 минут, чтобы желатин набух, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатина и разливают в пробирки по 5-8 мл. Посев провести уколом. Продолжительность культивирования 7-10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатина или его отсутствие отмечают визуально. Если желатин разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения - послойное, воронкообразное, пузырчатое и так далее.

б) Протеолиз казеина. Для выявления этой способности используют молочный агар - среду состоящую из равных частей стерильного обезжиренного молока и стерильного 3%-ного водного агара. Перед приготовлением среды молоко обезжирить центрифугированием в течение 15 минут при 2-3 тыс. об./мин. Жиры, которые образуют на поверхности молока плотную пленку, удалить, а молоко простерилизовать. Затем его добавить при постоянном помешивании к стерильному водному агару. Полученную среду разлить в чашки Петри. Бактерии посеять штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2-10 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросших по штриху микроорганизмов. Особенно четко она видна после обработки среды раствором 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Зоны гидролиза казеина измерить в мм от края штриха или колонии до границы светлой зоны. Чем больше диаметр активности бактерий.

Типы разжижения желатина:



10.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

10.4.Контрольные вопросы

1. Что такое ферменты?
2. Какие ферменты образуются в клетках микроорганизмов?
3. Как выявляют амилалитическую и протеолитическую активность?
4. Какие факторы влияют на ферментативную активность микроорганизмов?

Рекомендуемая литература

[1]с.7-29, [2] с.87-103

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ ВЫДЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРЫ. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

11.1. Цель работы: приобретение навыков определения чистоты выделенной культуры микроорганизмов.

11.2. Общие сведения.

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. Это осуществляется обычно несколькими способами – визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена. Такой контроль возможен только для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом. Для этого приготовить препарат фиксированных клеток и просмотреть его с иммерсионной системой или препарат живых клеток и просмотреть его. Чистая культура многих микроорганизмов, как правило, морфологически однородна; допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых бактерий, например, микробактерий, нокардий и других, полиморфные, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании вызывает некоторые затруднения. Чистоту культуры микроорганизмов обязательно проверяют высевом на питательные среды. Прежде всего выделенную культуру высевают на плотную среду, благоприятную для ее роста. Однородность выросших колоний – свидетельство чистоты культуры. Обязателен посев на

МПА – среду, которая обеспечивает рост многих хемотротрофов. Критерием чистоты культуры является однородность выросших колоний, или, напротив, отсутствие роста, если данные микроорганизмы на МПА не развиваются. Следуют иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на МПА. Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофов, склонных к симбиозу с одним или несколькими спутниками. Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют посевом еще на ряд сред – сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и другие. Набор сред и их состав определяются особенностями метаболизма выделенных микроорганизмов, а также их возможных спутников.

11.3. Практическая часть

К культуральным свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Рост на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колоний, штриха или сплошного газона. Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшие в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

форму колонии - округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и другие (рис. 54);

размер (диаметр) колонии измеряют в мм; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

поверхность колонии - гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

профиль колонии - плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и так далее (рис.55);

блеск и прозрачность - колония блестящая, матовая, тусклая, муцистая, прозрачная;

цвет колонии - бесцветная (грязно-белые колонии относят бесцветным) или пигментированная - белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо выделяют выделение пигмента в субстрат ;

край колонии - ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и так далее;

структуры колонии - однородная, мелко- или крупно-зернистая, струйчатая и так далее. Край и структуру колоний определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку помещают на столик микроскопа крышкой вниз;

консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистый (прилипает к петле), тягучей, пленчатой (снимаются целиком), крепкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции имеющие

форму овалов с заостренными концами. Лишь глубинные колонии немногих бактерий напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если развивающиеся микроорганизмы выделяют углекислоту

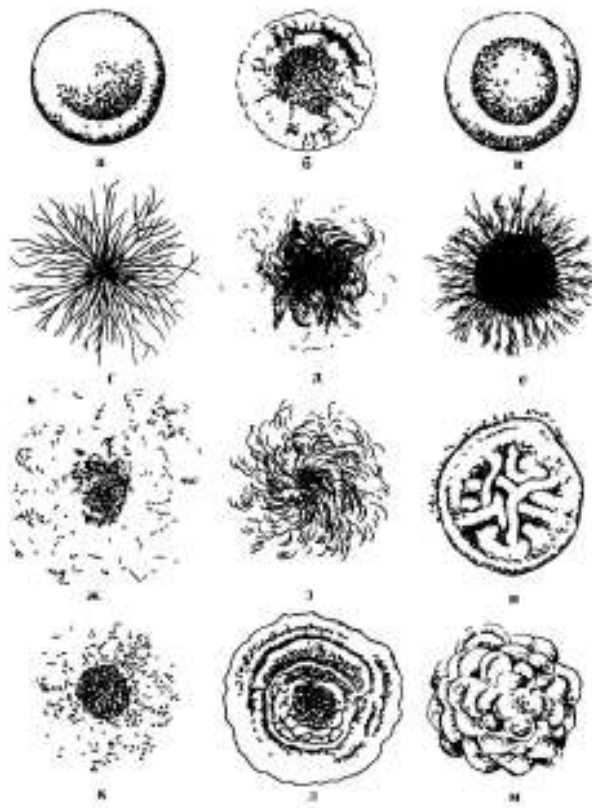


Рис 54 Форма колоний: а - круглая, б - круглая с фестончатым краем, в - круглая с валиком по краям, г, д - ризоидные, е - круглая с ризоидным краем, ж - амёбовидная, з - нитевидная, и - складчатая, к - неправильная, л - концентрическая, м - сложная

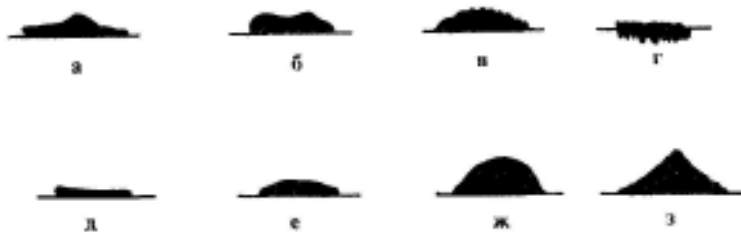


Рис.55. Профиль колоний: а - изогнутый; б - кратерообразный; в - бугристый; г -врастающий в субстрат; д - плоский; е - выпуклый; ж - каплевидный; з - конусовидный.

Размеры и некоторые другие особенности колонии изменяются с возрастом и зависят от состава среды, поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

При описании роста микроорганизмов по штриху отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный; сплошной с ровным или волнистым краем; четковидный, напоминающий цепочку изолированных колоний; диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

Рост в жидких питательных средах.

Рост микроорганизмов в жидких средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост в жидкой среде отличают степень помутнения - слабая, умеренная или сильная; особенности пленки - тонкая плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, а при образовании осадка указывают - скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп; предметные и покровные стекла, бактериологическая петля, фильтровальная бумага, набор красок, раствор Люголя, иммерсионное масло.

11.3.1.Методика выполнения работы

Просмотреть чашки Петри, засеянные на предыдущем занятии. Подсчитать число выросших колоний.

Отобрать 2-3 изолированные колонии, описать их, зарисовать.

Изучить морфологию клеток отобранных культур, приготовив препараты "раздавленная петля".

Обратить внимание на подвижность, форму и соединение клеток бактерий .

Результаты оформить в виде таблицы.

Культуральные и морфологические особенности исследуемых бактерий.

№	Колония								Микроскопи	
культуры	форма	размер	цвет	край	блеск	пове- рхно- сть	проф- иль	рису- нок	подви- жность	клеток
1.										
2.										
3.										
4.										

1. Что такое чистая культура?
2. Какими способами можно определить чистоту выделенной культуры?
3. Что такое культуральные признаки микроорганизмов?

Рекомендуемая литература

[1] с.61-75

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ.

12.1. Цель работы: приобретение навыков определения количества клеток микроорганизмов.

12.2. Общие сведения.

Число клеток в единице объема можно определить непосредственным подсчетом их под микроскопом. Для этого пользуются счетными камерами, капиллярами Перфильева, препаратами фиксированных и окрашенных клеток, приготовленных на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема. Следует помнить, что подсчитываются все клетки, как живые, так и мертвые.

12.3. Практическая часть

Метод подсчета клеток рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов - дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева - Тома. Камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. На центральную часть стекла нанесена сетка. Площадь квадрата сетки указана на одной из сторон предметного стекла и соответствует 1/25 мм (большой квадрат) или 1/400 мм (малый квадрат). Часть предметного стекла, на которой нанесена сетка, на 0,1 мм ниже двух других сторон. Это глубина камеры; она всегда указывается на предметном стекле.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным раствором покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны для появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. При этом условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 5 минут после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

Число клеток подсчитывается с объективом х8 или х40. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом - 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.

Точность определения зависит от того, насколько плотно пришлифовано покровное стекло к поверхности камеры, поэтому подсчет клеток повторяют 3-4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10}{h \cdot S} \cdot n,$$

где М – число клеток в 1 мл суспензии;

а – среднее число клеток в квадрате сетки;

h – глубина камеры в мм;
 S – площадь квадрата сетки;
 10 – коэффициент перевода в см мм;
 n – разведение исследуемой суспензии.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, счетная камера Горяева; бактериологическая петля; стерильные петли на 0,1-0,2; 1 мл, термометр, электроплита.

12.3.1. Методика выполнения работы

Приготовить дрожжевую суспензию в химическом стакане.

Пользуясь счетной камерой Горяева - Тома посчитать количество клеток дрожжей в 1 мл культуры.

Сравнить интенсивность роста дрожжей при разной температуре, пользуясь счетной камерой.

12.3.2. Оформление работы.

Рассчитать количество клеток дрожжей пользуясь приведенной выше формулой. Написать отчет о проделанной работе.

12.4. Контрольные вопросы

1. Какие вам известны способы подсчета клеток микроорганизмов?
2. Что представляет собой камера Горяева – Тома?

Рекомендуемая литература

[1]с.209-238

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13

ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ.

13.1. Цель работы: приобретение навыков микробиологического исследования пищевых продуктов.

13.2. Общие сведения.

Употребление в пищу продуктов обсемененных микробами или зараженных токсинами микроорганизмов может привести к пищевым отравлениям. Пищевые токсикоинфекции вызываются :

1. чаще всего представителями паратифозных бактерий из группы *Salmonella*; палочками *Breslau*, *Gartneri* и некоторыми другими.
2. группой так называемых патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Bacterium proteus* и другие).
3. анаэробной палочкой *Clostridium botulinum*.

Чтобы не допустить пищевых отравлений на предприятиях пищевой промышленности проводят микробиологический контроль пищевых продуктов.

13.3. Практическая часть

Объектами исследования могут быть различные пищевые продукты и приготовленные из них блюда (мясо, рыба, колбаса, консервы, молочные изделия, холодные блюда и другие).

Для исследования продуктов твердой консистенции берут пробы с поверхности и из глубины.

Приборы, реактивы, посуда: микроскоп, набор красителей , иммерсионное масло, среда Эндо, молочно-солевой агар(к 100 мл МПА, содержащего 6,5% поваренной соли, перед употреблением 10 мл снятого стерильного молока, рН 7,4).

13.3.1.Методика выполнения работы

С поверхности пищевого продукта (мясо, колбаса) сделать соскоб стерильным скальпелем с разных мест. При взятии проб из глубины кусок пищевого сырья (5 – 10 г) обжечь или погрузить на 5 минут в кипящую воду. Затем разрезать его пополам, взять из центральной части небольшой кусочек (1 –

3 г) и сделать препараты отпечатки на стерильном предметном стекле , провести окраску по Грамму. Кроме того произвести посевы на среде Эндо путем прикосновения поверхностью кусочка.

Если при микроскопировании препаратов-отпечатков обнаруживается много микроорганизмов, то перед посевом исследуемый кусочек растереть в ступке и из полученной кашицы сделать посев штрихом или шпателем в чашках со средой Эндо.

Продукты жидкой консистенции забирают для посева стерильными пипетками.

При исследовании консервов произвести тщательную стерилизацию поверхности банки. Перед посевом обжечь в пламени одну из сторон банки, где сделать затем стерильным ножом отверстие, через которое стерильной пипеткой взять материал для исследования. При исследовании жидкостей посевы произвести как непосредственно из жидкости, так и из осадка в ней после центрифугирования.

Для обнаружения стафилококка проводят микроскопию мазков и посев материала (крем кондитерских изделий и молочные продукты) на молочно-солевой агар.

13.3.2. Оформление работы.

Зарисовать в тетради форму клеток микроорганизмов. Написать отчет о проделанной работе.

13.4.Контрольные вопросы

1. Что является причиной пищевых интоксикаций?
2. Какие вам известны пищевые токсикоинфекции?
3. Какие пищевые инфекции вам известны?
4. Какие микроорганизмы относят к санитарно-показательным?

Рекомендуемая литература

[1] с. 172-188

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА – ПРОБА НА
РЕДУКТАЗУ.

14.1. Цель работы: приобретение навыков микробиологического исследования молока.

14.2. Общие сведения.

Для определения редуктазы отбирают среднюю пробу молока после органолептической оценки. Тщательно перемешивают. Отбирают 50 мл в стерильную колбу, которую закрывают стерильной пробкой.

Микробиологическое исследование проводят тот час же или не позднее 4 часов с момента отбора проб.

14.3. Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда: пробирки, метиленовый голубой, молоко, водяная баня, термометр.

14.3.1. Методика выполнения работы

Проба на редуктазу является косвенным показателем обсемененности непастеризованного молока.

В пробирки налить по 1 мл рабочего раствора метиленового голубого и по 20 мл исследуемого молока, закрыть пробками и смешать путем медленного трехкратного переворачивания. Пробирки поместить на водяную баню при температуре 38°C. Вода в водяной бане после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Момент погружения пробирок в водяную баню считать началом анализа.

Наблюдение за изменением окраски проводить через 20 минут, через 2 часа. Через 5,5 часов после начала анализа. Окончанием опыта считать момент обесцвечивания окраски молока. В зависимости от продолжительности обесцвечивания молоко относят к одному из классов .

класс	Оценка качества молока	Продолжительность обесцвечивания	Число бактерий в 1 мл молока
1	хорошее	Свыше 5,5 ч	Менее 500 тыс.
2	удовлетворительное	2 – 5,5 ч	500тыс.-4 млн.
3	плохое	20 мин – 2 ч	4 млн.-20 млн.4
4	Очень плохое	До 20 мин	20 млн. и более

14.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

14.4.Контрольные вопросы

- 1.Что показывает проба на редуктазу?
- 2.В чем заключается методика определения пробы на редуктазу?

Рекомендуемая литература

[1]с.277-315

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15

ЭПИФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ЗЕРНА

15.1. Цель работы: приобретение навыков выявления эпифитных микроорганизмов.

15.2. Общие сведения

На поверхности зерна обитают разнообразные микроорганизмы. Часть из них попадает туда из ризосферы, часть заносится с пылью и насекомыми. Однако на зерне, как и на прочей поверхности растений, развиваются лишь отдельные виды микроорганизмов, называемые эпифитами. Эпифитные микроорганизмы, размножающиеся на поверхности стеблей, листьев и семян растений, получили название микроорганизмов филлосферы.

Эпифиты питаются продуктами экзосмоса растений; устойчивы к высоким концентрациям фитонцидов, выдерживают периодические колебания влажности.

Численность этих микроорганизмов невелика, и видовой состав их довольно постоянен: более 90 % составляют гниlostные бактерии, в основном неспороносные бактерии (род *Pseudomonas*). Особенно часто на зерне встречается *P. herbicola* (*Erwinia herbicola*), образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *P. fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть и полезны для растений, так как препятствуют проникновению паразитов в ткани растения. На хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказываться отрицательно.

На развитие микроорганизмов на зерне, а следовательно, на сохранность последнего решающее влияние оказывают: влажность, температура, степень аэрации, целостность зерна и состояние его покровных тканей. В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и недоступна микроорганизмам, которые в этом случае находятся в состоянии анабиоза (покоя).

На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы размножаются и тем быстрее, чем выше температура. Развитие микробиологических

процессов на хранящемся зерне с повышенной влажностью приводит к заметному, а иногда и очень значительному повышению температуры. Это явление получило название "термогенез".

Самосогревание зерна ведет к смене микрофлоры. Свойственная зерну эпифитная микрофлора исчезает. Начинают обильно размножаться непигментированные неспороносные палочки, вытесняющие *Erwinia herbicola*. Позднее появляются термостойкие (термотолерантные) микрококки, на плотных средах чаще всего образующие мелкие белые плоские колонии, а также плесневые грибы, актиномицеты. Самосогревание свыше 40...50°C способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий. По мере самосогревания изменяется видовой состав и плесневых грибов. Виды *Penicillium* преобладающие вначале, заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить не только о том, подвергалось ли зерно самосогреванию, но и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Erwinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хороших качеств. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести.

Кроме порчи самого зерна благоприятные условия для развития на его поверхности микроорганизмов приводят к накоплению выделяемых ими токсинов. При скармливании такого зерна скоту и домашней птице возникают отравления. Таким образом, правильное хранение зерна сводится к тому, чтобы не допускать развития на нем микроорганизмов.

15.3. Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда: зерно в колбах - свежее и хранившееся в условиях повышенной влажности, весы, часовые стекла, колбы со стерильной

водой (по 90 мл), колбы со стерильной водой (по 50 мл) и песком, стерильные пипетки Мора на 10 и 1 мл, стерильные чашки Петри, МПА в пробирках и колбах, водяная баня, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

15.3.1.Методика выполнения работы

Количественный учет микроорганизмов на зерне. Навеску массой 5 г поместить в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2...3 г песка. Колбу взбалтать круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки приготовить разведения (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}). Отдельными стерильными пипетками Мора взять по 10 мл суспензии и перенести в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды. Затем из каждой колбы взять по 1 мл суспензии соответствующего разведения в стерильные чашки Петри в двух повторностях. В каждую чашку Петри вылить по одной пробирке расплавленного, но предварительно охлажденного до 50 °С МПА. Чашки инкубировать при 30° С. Наряду с МПА используют элективные среды .

Через три-пять дней инкубации подсчитать общее число колоний, выросших на МПА в чашках, и рассчитать количество микроорганизмов на 1 г зерна.

Определение качественного состава микрофлоры зерна. Колонии сгруппировать по культуральным признакам. Из каждой группы колоний приготовить препараты, выявить принадлежность микроорганизмов к роду или семейству и определить численность бактерий каждой группы в процентах общего числа микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа сделать заключение о качестве зерна. На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80 %), образующая блестящие оранжевые колонии. Встречается *Pseudomonas fluorescens*, формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи - блестящие,

выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выявляются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела.

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также неспороносные палочки. При учете на сусло-агаре выявляется значительное количество грибов, главным образом относящихся к роду *Penicillium*, а также *Aspergillus*.

15.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

15.4. Контрольные вопросы

1. Что показывает проба на редуктазу
1. Какие микроорганизмы относят к эпифитам?
2. Какую группу микроорганизмов называют фитопатогенными?
3. Какие эпифиты характерны для зерна злаковых культур?

Рекомендуемая литература

[1] с.209-238

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПОЛУФАБРИКАТАХ.

16.1. Цель работы: приобретение навыков определения количества микроорганизмов полуфабрикатах.

16.2. Общие сведения

Для учета количества дрожжей и молочнокислых бактерий в полуфабрикатах принят метод прямого подсчета Бургвица, или постоянно окрашенных препаратов.

16.3. Практическая часть

Приборы, реактивы, посуда этиловый спирт 96%, формалин, метиленовый синий, полуфабрикат (закваска, тесто, жидкие дрожжи), вода.

16.3.1. Методика выполнения работы

Отвесить 10 г полуфабриката. Тщательно размешать его и поместить в фарфоровую чашку. Отмерить мерным стаканом 500 мл водопроводной воды и постепенно добавлять воду к полуфабрикату, тщательно растирая его стеклянной палочкой. Полученную суспензию перенести в колбу вместимостью 1 л, закрыть пробкой и энергично встряхивать в течение 1 минуты. При этом разрушаются скопления микробных клеток и клетки отделяются от частичек муки.

Каплю полученной взвеси наносят мерной пипеткой на камеру Горяева-Тома. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют спиртом с формалином (75% 96% спирта и 1,95 формалина). Высохший препарат окрасить метиленовым синим и выдержать 10 – 15 минут. Затем осторожно промыть под струей воды и высушить.

Препарат поместить на предметный столик микроскопа и с объективом х40 просмотреть 50 полей зрения с интервалами между каждым полем зрения в одном ряду 2 мм и между рядами 4 мм.

В каждом поле зрения посчитать количество дрожжей и бактерий и суммировать их.

Количество клеток дрожжей и бактерий в 1 г полуфабриката определить по формуле

$$N=nPQ/pqg,$$

Где n - среднее арифметическое число клеток в одном поле зрения, P - площадь препарата, Q - количество воды, взятое на разбавление пробы, мл, p - площадь поля зрения микроскопа, мм^2 , q - объем капли взвеси, мл, g - количество взятого полуфабриката (10 г).

Для определения объема капли взвеси отсчитать 10 капель. Объем одной капли составит 0,1 общего количества жидкости, выпущенной из пипетки

16.3.2. Оформление работы.

Написать отчет о проделанной работе.

16.4. Контрольные вопросы

1. Расскажите методику подсчета количества дрожжей и молочнокислых бактерий в полуфабрикатах.

Рекомендуемая литература

[1]с.239-276

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. Микробиология в пищевой промышленности. М. Пищевая промышленность, 1975.-501 с.
2. Емцов В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология.- М. Колос, 1993.-383 с.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии.- М. МГУ, 1983.- 221 с.
4. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии .-М. Колос, 1993.-175 с.
5. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности.-М. ИРПО, изд.центр «Академия», 2000.-136 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Рецепты приготовления некоторых красителей и растворов.

1. Фуксин основной, насыщенный спиртовой раствор: фуксин основной – 10 г, этанол 96% - 100 мл.
2. Фуксин основной карболовый (Циля): 5% водный раствор свежеприготовленного фенола -100 мл, насыщенный спиртовой раствор фуксина основного – 10 мл. Приготовленную смесь через 48 часов отфильтровывают. Краситель отличается устойчивостью.
3. Фуксин основной водный раствор: карболовый фуксин Циля – 1 мл, вода дистиллированная -9 мл. Водный фуксин готовят непосредственно перед употреблением, он не стоек.
4. Метиленовый синий, насыщенный раствор: метиленовый синий – 3 г, 96% этанол – 100 мл. Раствор оставляют на 2-3 дня, несколько раз перемешивают (взбалтывают), затем фильтруют. Раствор устойчив.
5. Генциановый фиолетовый карболовый раствор: 1 – генциановый фиолетовый – 1 г, этанол 96% - 10 мл, раствор 2 – 5% водный раствор свежеприготовленного фенола – 100 мл. После полного растворения генцианового фиолетового растворы смешивают.
6. Раствор Люголя в модификации Грамма: Йод кристаллический – 1 г, калий йодистый – 2 г, вода дистиллированная – 300 мл. В ступку емкостью 30-50 мл помещают навеску йода и йодистого калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды и продолжая растирать кристаллы, добавляют еще 5 мл воды. Йод растворяется в йодистом калии. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Раствор хранить в темной посуде не более 30 дней.

7. Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы: йод кристаллический – 1 г, калий йодистый – 3 г, вода дистиллированная – 300 мл. Раствор готовят также , как предыдущий.

8. Приготовление туши для негативной окраски: тушь черная – 10 мг, вода дистиллированная - 30 мл. Разведенную тушь центрифугируют, надосадочный слой разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм.

9. Реактивы для крахмало-йодной пробы: крахмал – 0,4 г, хлористый цинк – 2,0 г, вода – 100 мл. Хлористый цинк растворяют в 10 мл воды, кипятят и добавляют крахмал. Доводят объем до 100 мл и оставляют стоять неделю. Затем раствор фильтруют и добавляют равный объем 0,2% раствора йодистого калия.

10. Подготовка предметных и покровных стекол для препаратов. Новые стекла обычно кипятят в 1% растворе соды, затем промывают дистиллированной водой, слабым раствором соляной кислоты и вновь дистиллированной водой. Стекла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем не менее суток выдерживают в растворе хромовой смеси. От бихромата стекла отмывают в дистиллированной воде. Чистые стекла хранят в 96% этаноле.

11. Хромовая смесь. Хромовокислый калий растворяют в воде, затем в раствор осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят из расчета вода – 100 мл, двуххромовокислый калий – 6 г, серная кислота (плотность 1,84) – 100 мл.

Хромовая смесь сильно разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому работать с ней необходимо очень осторожно. Если смесь попала на руку или одежду, то пораженное место немедленно следует обмыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором аммиака или соды и снова водой.

Тесты.

ТЕМА 1

1. Назовите структурный компонент клетки, который имеется и у прокариот, и у эукариот
 - 1) эндоплазматическая сеть
 - 2) рибосомы

3) митохондрии

4) лизосомы

2. Назовите группу организмов, которых относят к неклеточным формам жизни

1). вирусы

2). прокариоты

3). эукариоты

4). растения

3. Определите признак, по которому все перечисленные организмы кроме одного, объединены в одну группу. Укажите «лишний» среди них организм.

1). кишечная палочка

2). стафилококк

3). холерный вибрион

3). дизентерийная амеба

4. Назовите один из структурных компонентов клетки, который имеется у эукариот, но отсутствует у прокариот.

1). наружная плазматическая мембрана

2). эндоплазматическая сеть

3). рибосома

4). включения

5. Назовите форму молекулы ДНК прокариот, по которой она отличается от ядерной ДНК эукариот

1). кольцо

2). линейная структура

3). разветвленная структура

4). кристаллическая структура

6. Назовите гетеротрофные подвижные организмы, которые всасывают питательные вещества, малоподвижны, не способны к фотосинтезу и запасают углеводы в форме гликогена

1). вирусы

2). бактерии

3). грибы

4). синезеленые водоросли

7. Как переводится термин «эукариоты»

1). доядерные

2). ядерные

3). безъядерные

4). полностью ядерные

8. По какому основному признаку ученые делят клеточные формы жизни на прокариоты и эукариоты

- 1). по форме клеток
 - 2). по функциям ядра
 - 3). по наличию или отсутствию четко оформленного ядра
 - 4). по количеству ядер в клетке
9. Как размножаются совершенные и несовершенные грибы вегетативным способом
- 1). спорангиоспорами, конидиями
 - 2). оидиями, бластоспорами, почками, аскоспорами
 - 3). цистами, зооспорами, зигоспорами, базидиоспорами
 - 4). оидиями, конидиями
10. Химический состав клеток грибов
- 1). содержание влаги – 75-85%, белков – 40-80%, жиров – 70-90%, углеводов -10-30%
 - 2). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-40%, жиров – 40%, углеводов - 60%
 - 3). содержание влаги – 75-85%, белков – 40-60%, жиров – 60%, углеводов – до 40%
 - 4). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-60%, жиров – 10%, углеводов – до 10%
11. Какую особенность имеют актиномицеты?
- 1). подвижные многоклеточные микроорганизмы в виде нитей со слизистым чехлом
 - 2). палочковидные бактерии образующие плодовые тела микроспоры, заключенные в слизь
 - 3). бактерии, размножающиеся почкованием
 - 4). бактерии лучистой формы, размножаются спорами, вызывают болезни людей, передаются насекомыми
12. Какие грибы относятся к базидиомицетам?
- 1). *Aspergillus niger*
 - 2). *Cladosporium fulfena*
 - 3). *Baletus satanis*
 - 4). *Botrytis aleti*
13. Какие грибы относятся к дейтеромицетам?
- 1). *Aspergillus niger*
 - 2). *Alternaria citri*, *Fusarium cepae*, *Phoma betae*, *Monilia fructigena*
 - 3). *Baletus satanis*
 - 4). *Botrytis aleti*
14. Отличительным признаком грибов является:
- 1). включение валютина в цитоплазме
 - 2). наличие мицелия
 - 3). зернистая цитоплазма
 - 4). наличие жгутиков
15. Какие грибы относятся к аскомицетам?
- 1). *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*
 - 2). *Baletus edulis*
 - 3). *Penicillium citri*
 - 4). *Botrytis cinerea*

ТЕМА 2

1. Назовите систематическую группу организмов, представители которой имеют в клетках особые органоиды движения – жгутики
 - 1). вирусы
 - 2). бактерии
 - 3). грибы
 - 4). растения

2. Структурным компонентом клеточных клеток истинных бактерий являются
 - 1). полифосфаты
 - 2). нуклеопротеиды
 - 3). пептидогликаны
 - 4). липопротеиды

3. Неодинаковое отношение бактерий к окраске по Грамму объясняется различным строением и составом
 - 1). протоплазмы
 - 2). клеточной стенки
 - 3). ядерного аппарата клетки
 - 4). различным химическим составом клетки

4. Относительно устойчивые к неблагоприятным условиям среды покоящиеся клетки у бактерий называются
 - 1). споры
 - 2). цисты
 - 3). аэросомы
 - 4). гранулезы

5. Какие функции бактериальной клетки выполняют рибосомы
 - 1). участие в энергетическом обмене
 - 2). защита клетки от высыхания
 - 3). участие в синтезе белка
 - 4). играет роль в обмене веществ с окружающей средой

6. Как переводится термин «прокариоты»
 - 1). доядерные
 - 2). ядерные
 - 3). безъядерные
 - 4). полностью ядерные

7. Сколько жгутиков имеют для передвижения перитрихи?
 - 1). один пучок
 - 2). жгутики по всей поверхности
 - 3). два жгутика
 - 4). один жгутик

8. Какую особенность имеют миксобактерии

- 1). Подвижные многоклеточные микроорганизмы в виде нитей со слизистым чехлом
- 2). палочковидные бактерии образующие плодовые тела миксоспоры, заключенные в слизь
- 3). бактерии, размножающиеся почкованием
- 4). бактерии лучистой формы, размножаются спорами, вызывают болезни людей, передаются насекомыми

9. Химический состав клеток бактерий

- 1). содержание влаги – 75-85%, белков – 40-80%, жиров – 70-90%, углеводов -10-30%
- 2). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-40%, жиров – 40%, углеводов - 60%
- 3). содержание влаги – 75-85%, белков – 40-60%, жиров – 60%, углеводов – до 40%
- 4). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-60%, жиров – 10%, углеводов – до 10%

10. Какую особенность имеют нитчатые бактерии

- 1). Подвижные многоклеточные микроорганизмы в виде нитей со слизистым чехлом
- 2). палочковидные бактерии образующие плодовые тела миксоспоры, заключенные в слизь
- 3). бактерии, размножающиеся почкованием
- 4). бактерии лучистой формы, размножаются спорами, вызывают болезни людей, передаются насекомыми

11. Сколько жгутиков для передвижения имеют лофотрихи

- 1). один пучок
- 2). жгутики по всей поверхности
- 3). два пучка
- 4). один жгутик

12. Какие функции бактериальной клетки выполняют клеточные мембраны

- 1). участие в энергетическом обмене
- 2). защита клетки от высыхания
- 3). участие в синтезе белка
- 4). играет роль в обмене веществ с окружающей средой

13. Назовите ученого, который впервые изучил явление брожения и выделил микроорганизмы – возбудители этого процесса

- 1) А.Левенгук
- 2) Р.Гук
- 3) Л. Пастер
- 4) Д. Балтимор

14. Назовите ученого, который впервые предложил питательные среды для выращивания микроорганизмов, иммерсионную систему микроскопа и окрашенные бактериальные препараты

- 1). А.Левенгук
- 2). Р. Кох
- 3).Л. Пастер
- 4)Д. Балтимор

15. Назовите систематическую группу организмов, к которой относят возбудителей тифа, чумы, туберкулеза, сибирской язвы

- 1). эукариоты
- 2). прокариоты
- 3). вирусы

ТЕМА 3

1. Назовите организмы, в которых отсутствуют рибосомы

- 1). вирусы
- 2). бактерии
- 3). грибы
- 4). Растения

2. В состав бактериофага входят ДНК и белки оболочки. Что из них проникает внутрь бактерии, поражаемой бактериофагом?

- 1). только белки
- 2). только ДНК
- 3). ДНК и белки оболочки
- 4). ни один из этих компонентов

3. Назовите группу химических соединений, которые являются носителями наследственной информации у представителей любой систематической группы организмов

- 1). нуклеиновые кислоты
- 2). белки
- 3). липиды
- 4). углеводы

4. Назовите организмы, которые не имеют цитоплазмы и собственной клеточной мембраны и содержат наследственный материал, который представлен молекулами ДНК или РНК и окружен белковой оболочкой.

- 1). вирусы
- 2). прокариоты
- 3). эукариоты
- 4). простейшие

5. Укажите структуры, которые невозможно выращивать на искусственных питательных средах

- 1) клетки прокариот
- 2) вирусы
- 3) клетки животных
- 4) клетки растений

6. Химический состав клеток дрожжей.

- 1). содержание влаги – 75-85%, белков – 40-80%, жиров – 70-90%, углеводов -10-30%
- 2). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-40%, жиров – 40%, углеводов - 60%
- 3) содержание влаги – 75-85%, белков – 40-60%, жиров – 60%, углеводов – до 40%
- 4). содержание влаги – 75-85%, белков – 15-60%, жиров – 10%, углеводов – до 10%

7.Какую особенность имеют фаги?

- 1). палочковидные и кокковидные формы, внутриклеточные паразиты
- 2). организмы без клеточной стенки, покрыты лишь мембраной разной формы
- 3). организмы более простой формы, чем бактерии, измеряются в нанометрах, внутриклеточные паразиты, вызывающие болезни у людей
- 4). мельчайшие микроорганизмы, вызывающие гибель бактерий, грибов

9. Какие функции бактериальной клетки выполняет капсула

- 1). участие в энергетическом обмене
- 2). защита клетки от высыхания
- 3). участвует в синтезе белка
- 4). играет важную роль в обмене веществ с окружающей средой

10. Назовите ученого, который является основоположником микробиологии

- 5) А.Левенгук
- 6) Р.Гук
- 7) Л. Пастер
- 8) Д. Балтимор

11.Грибы неспособны к фотосинтезу, потому что:

- 1). они живут в почве
- 2). не имеют хлорофилла
- 3). паразитируют на других живых организмах
- 4). имеют небольшие размеры

12.Бактерии и грибы относят к:

- 1). одному царству живой природы
- 2). царству растений
- 3). разным царствам живой природы
- 4) лишайникам

ТЕМА 4

1. Что означает питание микроорганизмов с помощью пассивной диффузии?
 - 1). осуществляется за счет разности осмотического давления (концентрации веществ)
 - 2). осуществляется за счет адсорбции веществ на поверхности (через мембрану)
 - 3). осуществляется за счет осмоса без затрат энергии
 - 4). осуществляется с помощью пермеаз против градиента концентрации
2. Какие микроорганизмы относятся к фотоавтотрофам?
 - 1). для синтеза органических веществ используют углекислый газ и световую энергию
 - 2). для синтеза органических веществ используют органические вещества и световую энергию
 - 3). для синтеза органических веществ используют углекислый газ и энергию химических реакций
 - 4). для синтеза органических веществ используют органические соединения и энергию химических реакций.
3. Что такое дыхание микроорганизмов?
 - 1). окисляются органические вещества только в присутствии сероводорода
 - 2). окисляются органические вещества полностью до воды и углекислого газа (в присутствии кислорода)
 - 3). окисляются органические соединения с промежуточными продуктами распада (без участия кислорода)
 - 4). окисляются органические вещества только в присутствии азота
4. Какие микроорганизмы относятся к факультативным анаэробам?
 - 1). для окисления органических веществ необходим молекулярный кислород
 - 2). для окисления органических веществ не требуется молекулярный кислород, достаточно водорода
 - 3). для жизнедеятельности кислород не только не нужен, даже вреден
 - 4). микроорганизмы нуждаются в присутствии кислорода, но не способны его использовать или могут приспосабливаться к использованию кислорода
5. Какие микроорганизмы в зависимости от оптимальной температуры жизнедеятельности относят к психрофильным?
 - 1). выдерживают экстремальные условия – температуру $+3^{\circ}\text{C}$ – 120°C – *Clostridium botulinum*
 - 2). теплолюбивые. выдерживающие максимальную температуру $+70^{\circ}\text{C}$ – 80°C , оптимум $+55^{\circ}\text{C}$ – 65°C – *Bacillus aerothermophilus*
 - 3). холодолюбивые, выдерживающие максимальную температуру -25°C – 30°C , оптимум 0°C – 10°C – *Pseudomonas*
 - 4). среднетеплолюбивые, выдерживающие максимальную температуру $+45^{\circ}\text{C}$ – 50°C , оптимум $+25^{\circ}\text{C}$ – 35°C – *Brucella*, *Shigella*
6. Явление, при котором из-за более высокого осмотического давления среды микробная клетка обезвоживается, называется
 - 1). симбиоз

- 2). плазмоптис
- 3). антагонизм
- 4). Плазмолиз

7. Какие микроорганизмы в зависимости от оптимальной температуры жизнедеятельности относят к мезофильным?

- 1). выдерживают экстремальные условия – температуру +93°-120°C – *Clostridium botulinum*
- 2). теплолюбивые. выдерживающие максимальную температуру +70° -80°C, оптимум +55°-65°C – *Bacillus aerothermophilus*
- 3). холодолюбивые, выдерживающие максимальную температуру -25°-30°C, оптимум 0°--10°C – *Pseudomonas*
- 4). среднетеплолюбивые, выдерживающие максимальную температуру +45°-50°C, оптимум +25°-35°C – *Brucella*, *Shigella*

8. Микроорганизмы – гетеротрофы по использованию азота, углерода и энергии в конструктивном питании

- 1). для протекания реакций и усвоения углерода используют энергию света
- 2). для протекания реакций и усвоения углерода используют энергию химических реакций окисления неорганических или органических соединений
- 3). в качестве источника углерода для синтеза веществ используют органические соединения
- 4). в качестве источника углерода для синтеза веществ используют углекислый газ, для синтеза азотистых веществ аммиак, азот, сернистые соединения.

9. Галофитами называют микроорганизмы:

- 1). развивающиеся при высоком осмотическом давлении
- 2). способные жить в глубоком вакууме
- 3). способные жить при высокой концентрации солей
- 4). способные жить при низких температурах окружающей среды

10. Явление, при котором из-за очень низкого осмотического давления среды происходит разрыв микробной клетки, называется

- 1). симбиоз
- 2). плазмоптис
- 3). антагонизм
- 4). Плазмолиз

11. Какие микроорганизмы в зависимости от способности выдерживать различную pH среду относятся к ацидофильным?

- 1). Экстремально кислотолубивые, живущие в уксусной кислоте
- 2). Кислотолубивые, pH – оптимум - < 4 (бактерии уксуснокислые, молочнокислые, пропионовокислые)
- 3). Щелочелюбивые, pH – оптимум - > 9 (холерный вибрион)
- 4). Любящие нейтральную среду pH – оптимум 4-9 (гнилостные бактерии, некоторые липолитические, кишечная палочка, возбудители пищевых отравлений).

12. Как влияют радиоактивные α -, β -, γ -лучи на развитие микроорганизмов?

- 1). лучи с длиной волны 1000-300 нм необходимы только фотосинсебилизирующим микроорганизмам. При их отсутствии они развиваются ненормально. Патогенные микроорганизмы менее устойчивы к свету, чем сапрофитные. При облучении лучами с длиной волны 10-300 нм клетка теряет способность к делению. Лучи с длиной волны 250 нм и менее губительны для микроорганизмов.
- 2). лучи с длиной волны 5-40 кГр вызывают радиолиз воды в клетках с образованием свободных радикалов, что приводит к мутации, изменению свойств микроорганизмов или к их гибели
- 3). лучи с длиной волны 760-400 нм не вызывают фотохимических изменений в клетках, но обладают тепловой энергией, вызывающей денатурацию белков и гибель микроорганизмов
- 4). лучи с длиной волны 40-65 Крад вызывают морфологические изменения в клетке, гибель. Наиболее чувствительны к ним вирусы, кишечная палочка

13. Как влияет ультразвук на развитие микроорганизмов?

- 1). электромагнитные колебания с короткой длиной волны 50-70 нм обладают тепловой энергией, способствующей образованию в субстрате переменного тока. Вызывает гибель микроорганизмов
- 2). с помощью оптических квантовых генераторов получают фокусированный пучок электромагнитного излучения в диапазоне от инфракрасного до ультрафиолетового спектров с большой энергией, который способен вызывать сильное биологическое воздействие
- 3) колебания с частотой более 20 тыс. в сек (20 кГц) способствует распаду высокомолекулярных соединений. Обеспечивает бактерицидное действие
- 4). виды энергии с высокой тепловой отдачей, обеспечивают гибель микроорганизмов и всего живого

14. Как влияют видимый свет и ультрафиолетовые лучи на развитие микроорганизмов?

- 1). лучи с длиной волны 1000-300 нм необходимы только фотосинсебилизирующим микроорганизмам. При их отсутствии они развиваются ненормально. Патогенные микроорганизмы менее устойчивы к свету, чем сапрофитные. При облучении лучами с длиной волны 10-300 нм клетка теряет способность к делению. Лучи с длиной волны 250 нм и менее губительны для микроорганизмов.
- 2). лучи с длиной волны 5-40 кГр вызывают радиолиз воды в клетках с образованием свободных радикалов, что приводит к мутации, изменению свойств микроорганизмов или к их гибели
- 3). лучи с длиной волны 760-400 нм не вызывают фотохимических изменений в клетках, но обладают тепловой энергией, вызывающей денатурацию белков и гибель микроорганизмов
- 4). лучи с длиной волны 40-65 Крад вызывают морфологические изменения в клетке, гибель. Наиболее чувствительны к ним вирусы, кишечная палочка

15. Как влияют волны СВЧ, ВЧ, УВЧ на развитие микроорганизмов?

- 1). электромагнитные колебания с короткой длиной волны 50-70 нм обладают тепловой энергией, способствующей образованию в субстрате переменного тока. Вызывает гибель микроорганизмов

2). с помощью оптических квантовых генераторов получают фокусированный пучок электромагнитного излучения в диапазоне от инфракрасного до ультрафиолетового спектров с большой энергией, который способен вызывать сильное биологическое воздействие

3) колебания с частотой более 20 тыс. в сек (20 кГц) способствует распаду высокомолекулярных соединений. Обеспечивает бактерицидное действие

4). виды энергии с высокой тепловой отдачей, обеспечивают гибель микроорганизмов и всего живого

16..Как называется форма взаимоотношений, когда организмы одного вида используют особей другого вида в качестве среды обитания и источника пищи, причиняя им вред, но не вызывая их немедленной гибели?

- 1). конкуренция
- 2). хищничество
- 3). паразитизм
- 4). симбиоз

17.Как называется форма взаимоотношений, когда каждый из двух взаимодействующих видов извлекает пользу из связи с другим видом?

- 1). конкуренция
- 2). хищничество
- 3). паразитизм
- 4). симбиоз

18.Стерилизованное молоко хранится дольше пастеризованного, потому что при его обработке уничтожаются:

- 1). только клетки бактерий
- 2). только споры бактерий
- 3). клетки и споры бактерий
- 4). только болезнетворные бактерии

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

6. Жвирблянская А.Ю., Бакушинская О.А. Микробиология в пищевой промышленности. М. Пищевая промышленность, 1975.-501 с.
7. Емцов В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология.- М. Колос, 1993.-383 с.
8. Руководство к практическим занятиям по микробиологии.- М. МГУ, 1983.-221 с.
9. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии .-М. Колос, 1993.-175 с.
10. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности.-М. ИРПО, изд.центр «Академия», 2000.-136 с.

