



Уральский
федеральный
университет

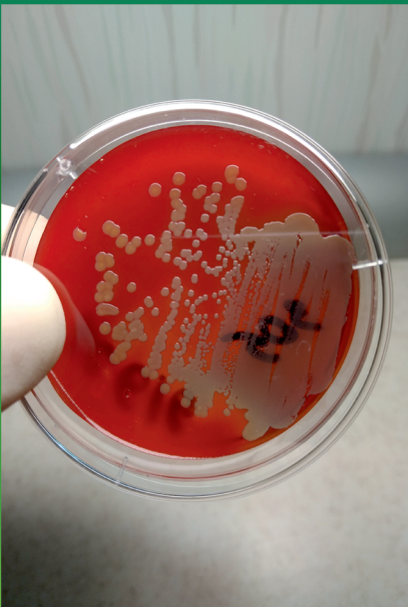
имени первого Президента
России Б.Н.Ельцина

Институт естественных наук
и математики

Л. С. ЛАВРЕНЧУК
А. А. ЕРМОШИН

МИКРОБИОЛОГИЯ

Практикум



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин

МИКРОБИОЛОГИЯ

Практикум

Рекомендовано
методическим советом Уральского федерального университета
для студентов вуза, обучающихся по направлениям подготовки
06.03.01 «Биология», 05.03.06 «Экология и природопользование»,
по специальностям 30.05.01 «Медицинская биохимия»,
30.05.02 «Медицинская биофизика»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2019

УДК 579(075.5)
ББК 28.4я73.5
Л135

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра микробиологии Московского государственного университета
(заведующий кафедрой доктор биологических наук,
профессор *А. И. Нетрусов*);

О. В. Карначук, доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой физиологии растений и биотехнологии
Томского государственного университета

Лавренчук, Л. С.

Л135 Микробиология : практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин ; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. – 107 с.
ISBN 978-5-7996-2618-1

Практикум включает в себя 15 лабораторных работ, цель которых – ознакомить студентов с основными методами микробиологии и сформировать у них навыки работы с культурами микроорганизмов. В пособии также представлены материалы для контроля – тестовые задания, задания с открытыми ответами, список вопросов к экзамену.

Для студентов, изучающих дисциплины «Микробиология» и «Основы биотехнологии и биоинженерии» в рамках модулей «Биоразнообразие», «Организм и среда», «Современные методы в биологии», «Молекулярная фитобиотехнология», «Современные методы в биологии».

УДК 579(075.5)
ББК 28.4я73.5

На обложке:
фото Л. С. Лавренчука

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ	6
ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ	8
МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	11
Лабораторная работа № 1	11
Лабораторная работа № 2	16
Лабораторная работа № 3	20
Лабораторная работа № 4	27
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	36
Лабораторная работа № 5	36
Лабораторная работа № 6	43
Лабораторная работа № 7	47
Лабораторная работа № 8	50
Лабораторная работа № 9	57
Лабораторная работа № 10	63
ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКРООРГАНИЗМОВ	70
Лабораторная работа № 11	70
Лабораторная работа № 12	77
Лабораторная работа № 13	80
Лабораторная работа № 14	83
Лабораторная работа № 15	86
ПЛАН РАБОТЫ В СЕМЕСТРЕ	88
ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ	90
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ	94
ПРИМЕРНЫЕ ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ	98
РЕЦЕПТЫ РЕАКТИВОВ	102
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	104

ПРЕДИСЛОВИЕ

Микробиология – наука, объектом изучения которой являются микроорганизмы различных систематических категорий. В самом общем смысле в это понятие включаются бактерии, археи, вирусы, микроскопические водоросли, грибы и простейшие. В более узком смысле микробиология занимается изучением бактерий и архей, так как остальные микроорганизмы являются объектом интереса вирусологии, альгологии, микологии и т. д.

Микроорганизмы оказывают значительное влияние на биосферу в целом. В первую очередь они выступают в качестве незаменимого элемента биогеохимических циклов. Такие процессы, как, например, азотфиксация, разложение сложных растительных полимеров (лигнина, целлюлозы, суберина, пектина), могут осуществляться исключительно микроорганизмами. Они играют существенную роль в формировании и развитии природных сообществ. Именно микроорганизмы, которые первыми освоили кислородный фотосинтез, задали тенденцию эволюции всему остальному живому миру.

Велико значение микроорганизмов и для человека. Впервые человечество начало использовать их для своих целей за тысячелетия до обнаружения самих микроорганизмов в приготовлении хлеба и производстве алкогольных напитков. Помимо этого, микроорганизмы являются возбудителями инфекционных заболеваний, продуцентами в биотехнологии, модельными объектами для научных исследований.

Основные задачи курса микробиологии:

- формирование теоретических представлений о микроорганизмах – их морфологии, физиологии, биохимии и генетике;
- изучение экологического и таксономического разнообразия бактерий;
- понимание роли микроорганизмов в формировании и развитии биосферы;

- формирование практических навыков работы с микроорганизмами, работа в асептических условиях;
- подготовка образцов, микроскопирование препаратов микроорганизмов;
- приготовление питательных сред и выращивание микроорганизмов;
- освоение классических и современных методов исследования микроорганизмов;
- понимание практического и медицинского значения микроорганизмов для человека.

Микробиология тесно связана с биохимией, цитологией, генетикой, экологией, эволюционными теориями, медициной и множеством других наук. Для усвоения материала в рамках учебного курса «Микробиология» необходима прочная база по биохимии и цитологии в первую очередь, а также навыки работы с микроскопом.

Практикум состоит из нескольких частей:

- 1) 15 лабораторных занятий. Каждая лабораторная работа предваряется теоретическими основами и содержит в себе цель, список необходимого оборудования, ход работы и указания по заполнению рабочей тетради;
- 2) план лекций, лабораторных, домашних и проверочных работ;
- 3) вопросы для самоподготовки к текущей или промежуточной аттестации;
- 4) перечень примерных вопросов к экзамену;
- 5) методика приготовления реактивов;
- 6) список основной и дополнительной литературы.

Курс «Микробиология» изучается в пятом семестре третьего курса студентами, обучающимися по направлениям «Биология», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика» и «Экология и природопользование». Кроме того, данное учебное пособие будет полезно при изучении курсов «Основы биоинженерии и биотехнологии» на 4-м курсе бакалавриата и «Молекулярные фитобиотехнологии» в магистратуре. Авторы выражают благодарность Анне Иванец за помощь в оформлении пособия.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

1. Работа в лаборатории ведется исключительно в халатах и сменной обуви или бахилах.

2. Верхняя одежда и сумки не должны находиться в лаборатории.

3. Запрещается принимать пищу и пить воду в лаборатории.

4. Работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом.

5. При случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности дезинфицирующим раствором.

6. После работы необходимо тщательно вымыть руки с использованием дезинфекционных средств.

7. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и лишними вещами.

8. Студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.

9. К выполнению каждой лабораторной работы нужно приступать только после получения инструктажа по технике безопасности, ознакомления с методиками и разрешения преподавателя.

10. Лабораторную работу необходимо проводить в точном соответствии с описанием в методических указаниях.

11. Для проведения работы пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реактивов нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость.

12. Если в ходе опыта требуется нагревание, надо следовать предусмотренным методическими указаниями способам нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на спиртовке.

13. Нагревание предметного стекла в пламени спиртовки при приготовлении некоторых препаратов следует проводить равномерно.

14. Запрещается работать с неисправными электроприборами. О любых неисправностях следует незамедлительно информировать преподавателя.

15. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: помыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Стерильность – первое и основное условие работы в микробиологических лабораториях. Существует огромное количество способов эту стерильность обеспечить – более подробно о способах стерилизации объектов написано далее. Здесь же будут приведены правила соблюдения стерильности в процессе работы.

1. Стерильность лаборатории в целом обеспечивается надеванием халатов, сменной обуви/бахил, регулярной уборкой, облучением помещений и обработкой всех поверхностей дезинфицирующими средствами.

2. Стерильность на рабочем месте обеспечивается работой в ламинарных боксах, в которых производится фильтрация входящего воздуха ламинарными (без завихрений) потоками воздуха внутри рабочей зоны (рис. 1). Белыми стрелками обозначены потоки стерильного воздуха, черными – загрязненного, серыми – внешнего.

Перед началом работы должна проводиться обработка бокса УФ-излучением в течение 15–30 мин, затем – обработка поверхностей 70 % этанолом. Один раз в месяц следует разбирать съемные детали, мыть бокс изнутри и также обрабатывать его 70 % этанолом. Также в зависимости от интенсивности работы один раз в 3–6 месяцев необходимо проводить дезинфекцию фильтров парами формальдегида.

3. Стерильность рабочего пространства вне ламинарного бокса обеспечивается обработкой дезинфицирующими растворами рабочих поверхностей и работой газовых горелок/спиртовок. 15-сантиметровая (в среднем) зона вокруг пламени спиртовки является стерильной, и именно в ней необходимо проводить все работы.

4. Стерильность рабочего инструмента (микробиологических игл и петель) обеспечивается их прокаливанием в пламени спиртовки /газовой горелки. Также в пламени горелки обжигаются горлышки пробирок и колб до и после работы с ними.

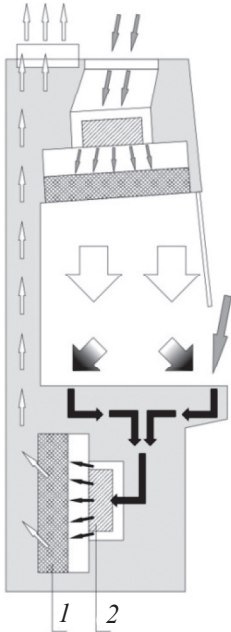


Рис. 1. Устройство ламинарного бокса:
1 – фильтр для очистки воздуха; 2 – вентилятор

5. Стерильность сред, остального инструмента и посуды обеспечивается их автоклавированием или обработкой сухим жаром.

6. Отбор микроорганизмов проводится по следующему алгоритму:

- Тремя пальцами правой руки (большим, указательным, средним) взять микробиологическую петлю и *прокалить* ее докрасна в пламени спиртовки.

- Пробирку с культурой взять в левую руку и, *не выпуская петли* оставшимися пальцами правой руки (безымянным и мизинцем), вынуть пробку из пробирки и *держат* ее двумя пальцами во время всех дальнейших манипуляций. Ни в коем случае не следует касаться пробкой каких-либо предметов и уж тем более класть на стол!

- Одновременно с выниманием пробки следует *обжечь горлышко* пробирки/ колбы во избежание ее загрязнения посторонней микрофлорой. Нужно помнить, что все работы должны проводиться в непосредственной близости от пламени спиртовки.

– *Охладить* петлю о внутренние стенки пробирки и отобрать из пробирки *небольшое количество* микроорганизмов, аккуратно извлечь петлю из пробирки.

- Вновь *обжечь* горлышко пробирки и закрыть ее пробкой.
- Проводить дальнейшие манипуляции с микроорганизмами.
- После проведения всех операций *прокалить петлю*.

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В данный раздел входят процедуры, затрагивающие базовые основы и правила работы в микробиологических лабораториях: методы асептики, приготовление мазков микробиологических препаратов, техника и разновидности микроскопии, методы количественного учета микроорганизмов. Студентам необходимо освоить данные методики, так как в дальнейшей учебе и карьере подобные навыки востребованы.

Лабораторная работа № 1

Микроскопирование микробиологических препаратов. Препараты живых микроорганизмов

Основные теоретические положения

Микроскопия до сих пор остается основным методом изучения микроорганизмов. Развиваясь, человечество предлагало все больше разнообразных способов модернизации как световой, так и электронной микроскопии. Некоторые из этих методов, наиболее часто использующихся в микробиологии, будут рассмотрены далее.

Метод светлого поля в проходящем свете – классический метод микроскопии, применяется для изучения объектов с неравномерной поглощающей способностью. Метод неэффективен, если объект прозрачен.

Метод темного поля в проходящем свете используется для изучения прозрачных и живых объектов. Свет в данном случае подается косыми лучами, поэтому фон у получаемого изображения темный.

Попадая на объект, косые лучи преломляются, изменяют свою траекторию и попадают в объектив. Таким образом, объекты фактически светятся на темном фоне. Особенно удобно использовать этот метод для изучения микроорганизмов с естественной окраской.

Метод фазово-контрастной микроскопии также используется для изучения прозрачных объектов. При прохождении света через прозрачный объект не изменяются его интенсивность и длина волны, но изменяется фаза. Однако человеческий глаз не способен это изменение уловить. Для работы методом фазового контраста необходимо модифицировать микроскоп и добавить фазовую пластинку в объектив и кольцевую диафрагму под конденсор. С помощью этих модификаций изменение фазы световой волны преобразуется в изменение амплитуды (яркости), что повышает контрастность объекта. Данный метод не увеличивает разрешающую способность микроскопа, но позволяет изучать прозрачные объекты.

В *методе люминесцентной микроскопии* используется способность некоторых молекул светиться при воздействии на них света определенной длины волны. Изначально использовалась естественная биолюминесценция – многие вещества живых организмов способны светиться сами по себе (хлорофилл и другие пигменты, порфирины).

Следующий этап – обработка биообъектов флуорохромами. Флуорохромы – красители, не вызывающие сильной окраски объектов в обычном свете, но флуоресцирующие при облучении ультрафиолетовыми/синими/фиолетовыми лучами. Из флуорохромов в микробиологии используют акридин оранжевый, корифосфин, примулин, родамин и др. Например, акридин оранжевый, проникнув в клетку, связывается с нуклеиновыми кислотами. Под действием ультрафиолетового излучения акридиновый оранжевый окрашивает РНК в оранжевый цвет, ДНК – в зеленый.

С развитием иммунологии появилась возможность присоединять флуорохромные маркеры к антителам. Антигены, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флуорохро-

мами, способны светиться в ультрафиолете люминесцентного микроскопа. Таким образом, появилась возможность «подсвечивать» отдельные молекулы.

Изменения также касаются и устройства микроскопа. Вместо обычных источников света используются ртутно-кварцевые или галогено-кварцевые лампы, испускающие ультрафиолетовые лучи. На пути пучка света устанавливаются светофильтры, ограничивающие свет ненужных длин волн. Этот тип микроскопии за счет свечения позволяет увидеть объекты, величиной меньшие, чем разрешающая способность микроскопа.

Препараты живых микроорганизмов:

– Препарат «раздавленная капля» – наиболее стандартный для изучения микроорганизмов в микробиологии. Суспензия микроорганизмов при этом находится под покровным стеклом.

– Препарат «висячая капля» используется для наблюдения процессов в микробиологии – движения и деления. Микроорганизмы в данном препарате находятся в своих естественных условиях.

– Препарат «отпечаток» изготавливается путем прикладывания предметного стекла к верхней части колонии (например, для исследования спороношения стрептомицетов) или к ткани, пищевым продуктам, кожным покровам или слизистым.

– Препарат «микрокультура» создается методом выращивания микроорганизмов сразу на предметном стекле, предварительно покрытом агаризованной питательной средой. Это позволяет наблюдать непосредственно за развитием колонии, ее структурой и расположением клеток.

Цели работы: сформировать представление о методах микроскопии и живых препаратах микроорганизмов; вспомнить правила работы с микроскопами; обнаружить бактерии различных морфотипов в готовых фиксированных препаратах и приготовленных живых.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные и покровные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.

5. Фильтровальная бумага и вата.
6. Источник микроорганизмов – молочные продукты, вода из водоемов, рассолы, протухшее мясо, пиво.
7. Готовые фиксированные препараты различного происхождения.
8. Стекла с лункой для препаратов «висячая капля».

З а д а н и е 1

Микроскопирование готовых фиксированных препаратов

Студенту предлагаются готовые препараты чистых микробиологических культур с бактериями различных морфотипов. Основная задача данного этапа – оценить размеры бактерий, пронаблюдать и описать (зарисовать) различные их морфотипы. В качестве примеров могут служить фиксированные препараты из медицинской практики и препараты естественных источников микроорганизмов – пива, кефира, рассолов.

З а д а н и е 2

Приготовление препарата «раздавленная капля»

В асептических условиях с помощью микробиологической петли нанести на предметное стекло каплю воды. Затем с помощью микробиологической петли внести культуру микроорганизмов в каплю. В случае работы с жидкими культурами можно наносить на стекло каплю культуры.

Воды и культуры нужно добавлять не более необходимого, то есть столько, чтобы после накрывания покровным стеклом жидкость не выступала за его края (в случае обратного – аккуратно убрать излишки фильтровальной бумагой). Клеток микроорганизмов не должно быть слишком много, они не должны заслонять друг друга, иначе препарат придется переделывать.

Покровное стекло следует подвести к капле ребром и, постепенно наклоняя, аккуратно опустить на каплю, стараясь не допускать образования пузырей воздуха.

Микроскопировать полученный препарат с помощью «сухих» объективов, то есть без иммерсии. Отметить подвижность и форму клеток (рис. 2).

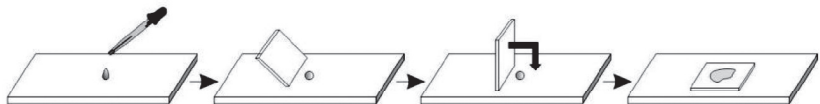


Рис. 2. Приготовление препарата «раздавленная капля»

З а д а н и е 3

Приготовление препарата «висячая капля»

Смазать вазелином края и дно лунки на специальном предметном стекле с углублением.

В асептических условиях микробиологической петлей отобрать суспензию микроорганизмов из пробирки с протухшим мясом.

Нанести каплю на покровное стекло.

Аккуратно перевернуть покровное стекло каплей вниз и поместить на предметное стекло с лункой таким образом, чтобы капля не касалась ни стенок, ни дна лунки, а висела свободно.

Пронаблюдать движение микроорганизмов, отметить разницу между двумя типами препаратов – висячей и раздавленной капли (рис. 3).



Рис. 3. Приготовление препарата «висячая капля»

Рассмотреть и отметить морфологическое строение исследуемых культур. В рабочей тетради написать отчет о проделанной работе, в нем описать препараты живых микроорганизмов, которые наблюдали, зарисовать форму микроорганизмов и процедуру приготовления препарата «висячая капля».

Вопросы для самоподготовки

1. Для чего в биологии используется фазово-контрастная микроскопия?
2. В чем преимущества и недостатки живых препаратов?
3. Что такое витальные красители, где они используются?

Лабораторная работа № 2

Окрашенные и фиксированные препараты микроорганизмов

Основные теоретические положения

Большинство клеток микроорганизмов в естественных условиях не окрашены и поэтому плохо видны в световой микроскоп, с трудом поддаются изучению. В связи с этим Р. Кох первым стал пробовать окрашивать микроорганизмы для их изучения. В настоящее время можно выделить следующие виды окраски:

– *Окраска прижизненная (витальная)*. Для нее используют только витальные красители, не вызывающие гибель клеток. Таковыми являются, например, водные растворы в концентрации 0,2–0,001 % метиленового синего, конго красного.

– *Окраска фиксированных препаратов*. В отличие от «живых» препаратов, фиксированные нет смысла изучать без окраски. Фиксация включает в себя и «убийство» клеток, поэтому возможности для применения различных окрасок не ограничены. Приготовление фиксированного препарата проходит в несколько стадий: приготовление мазка, высушивание мазка, фиксация мазка в пламени горелки либо в специальных фиксирующих жидкостях, окраска.

Фиксация препаратов имеет несколько целей: во-первых, как уже говорилось выше, это «убийство» микроорганизмов, во-вторых, обеспечение лучшего прилипания клеток к стеклу, а в-третьих, увеличение восприимчивости клеток к окраске за счет (опять же) их «убийства», так как мертвые клетки окрашиваются лучше живых. Также для рассмотрения фиксированных препаратов можно использовать иммерсию и иммерсионный объектив.

Кроме этого, окраску подразделяют на следующие виды:

– *Простая*, проходящая в одну стадию с использованием одного красителя; в качестве красителей обычно используют метиленовый синий, водный раствор фуксина, водный раствор сафранина.

– *Сложная*, когда окраска производится минимум двумя красителями с этапом отмывки между ними. Классический пример сложной окраски – окраска по Граму (с использованием трех краси-

телей), другой пример, использующийся в медицинской практике, – окраска по Циллю – Нельсону.

– *Дифференцированная*, при которой прокрашиваются определенные части микроорганизмов – капсула, нуклеоид, включения, жгутики и т. д.

В рамках данной лабораторной работы необходимо ознакомиться с методом окраски живых препаратов дрожжей раствором Люголя для выявления включений, окраской методом негативного контрастирования живых препаратов клеток, содержащих капсулу, а также со способом приготовления фиксированного окрашенного препарата.

Включения – довольно обширное понятие, под которым объединяются все везикулы, существующие в бактериальных клетках. Они могут содержать в себе питательные вещества – полисахариды, полифосфаты, липиды, серу. Помимо запасующей функции, включения могут регулировать осмотическое давление клетки. Кроме того, везикулы могут содержать фотосинтетические пигменты зеленых бактерий (хлоросомы) и цианобактерий (фикобилисомы). Некоторые водные микроорганизмы имеют газовые вакуоли. Окрашиваются включения опять-таки в зависимости от их содержимого – это раствор Люголя для полисахаридов, судан III либо судан черный для липидных гранул, метиленовый синий для полифосфатов (волютин).

Капсулы – структура, вырабатываемая бактериями на поверхности клеток. Она служит еще одним защитным слоем как от физических, так и от иммунологических воздействий. По природе своей гидрофильна, состоит из большого количества воды, связанной с полисахаридами и полипептидами. Капсула вследствие своих свойств практически не окрашивается. Окраску капсул можно провести методами негативного окрашивания с помощью туши – методами окраски мазка по Хиссу, Бурри – Гинсу или Дюгиду. Также существуют методы окраски по Романовскому – Гимзе и Михину с использованием красящих веществ.

Цель работы: изучить методы окраски микроорганизмов и способы приготовления фиксированного окрашенного препарата.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.
5. Фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло.
6. Чистые культуры микроорганизмов, в том числе образующих капсулу.
7. Суспензия пекарских дрожжей.
8. Красители: водный раствор сафранина, метиленовый синий, тушь, раствор Люголя.

З а д а н и е 1

Окраска включений

В асептических условиях внести на покровное стекло каплю культуры дрожжей.

Внести в суспензию клеток каплю раствора Люголя.

Накрыть препарат покровным стеклом и микроскопировать. Покровным стеклом нужно накрывать аккуратно, не допуская появления воздушных пузырей.

Отметить окрашивание гликогеновых включений дрожжей, внести в рабочую тетрадь процесс приготовления препарата и получившийся результат.

З а д а н и е 2

Окраска капсул

Нанести на предметное стекло каплю туши; промыть и прожечь петлю.

В асептических условиях внести в тушь каплю исследуемых микроорганизмов, имеющих капсулы. Распределить полученную смесь по стеклу петлей.

Накрыть покровным стеклом.

На темном фоне должны быть видны клетки, окруженные непрокрашенной капсулой.

Внести в рабочую тетрадь процесс приготовления препарата и получившийся результат.

З а д а н и е 3

Фиксированный окрашенный препарат

Обезжирить чистое предметное стекло мылом.

В асептических условиях нанести на него каплю воды, в которую петлей (также в асептических условиях) внести культуру бактерий (аналогично препарату «раздавленная капля»).

Этой же петлей распределить полученную суспензию максимально тонким слоем по поверхности стекла.

Высушить мазок, желательно при комнатной температуре. Если все было сделано правильно на этапе приготовления мазка (то есть было нанесено небольшое количество воды и распределено тонким слоем), то высушивание происходит быстро.

Зафиксировать мазок. Взять предметное стекло двумя пальцами и, держа предметное стекло мазком вверх, провести его через верхнюю часть пламени спиртовки (наиболее горячую) три раза.

Важно! Проводить предметное стекло через пламя необходимо и не слишком быстро (в этом случае не произойдет фиксация), и не слишком медленно (в этом случае велик шанс деформировать клетки).

Поместить препарат в штатив для окрашивания и нанести на него краситель. Выдержать 1 мин. (время может варьироваться в зависимости от красителя).

По истечению времени промывать препарат водой до тех пор, пока стекающая вода не обесцветится.

Микроскопировать с объективом 100 × с использованием иммерсионного масла. Отметить морфологию исследуемых клеток, сравнить окрашенный фиксированный и препарат с прижизненной окраской (рис. 4).

Внести в рабочую тетрадь процесс приготовления фиксированного окрашенного препарата. Подобная методика является базовой для приготовления наиболее распространенных сложных окрасок.

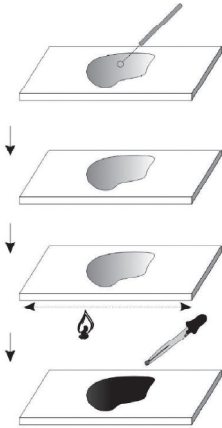


Рис. 4. Приготовление фиксированного окрашенного препарата

Вопросы для самоподготовки

1. Какие процессы входят в понятие фиксации препарата?
2. Какие преимущества и недостатки есть у фиксированных препаратов?
3. Назовите основные функции капсул у бактерий.

Лабораторная работа № 3

Сложные и дифференцированные методы окраски фиксированных препаратов микроорганизмов

Основные теоретические положения

Сложные методы окраски предполагают использование как минимум двух красителей со стадией отмывки между ними. Обесцвечивание может проводиться как водой, так и другими жидкостями – спиртами или кислотами. Классическим примером такой окраски является окраска по Граму. Все бактерии условно делят на грамположительные и грамотрицательные в зависимости от строения их клеточных стенок. В данном случае прослеживается связь между строением клеточной стенки и ее способностью удерживать в себе краситель.

Грамположительные бактерии имеют многослойную клеточную стенку, состоящую из пептидогликана (до 90 % сухой массы)

с «вкраплениями» тейхоевых кислот. Данная клеточная стенка однообразна и не имеет еще одной внешней мембраны (рис. 5). При обработке анилиновым красителем вместе с йодом клеточная стенка прокрашивается, а при последующей отмывке спиртом не теряет своей окраски.

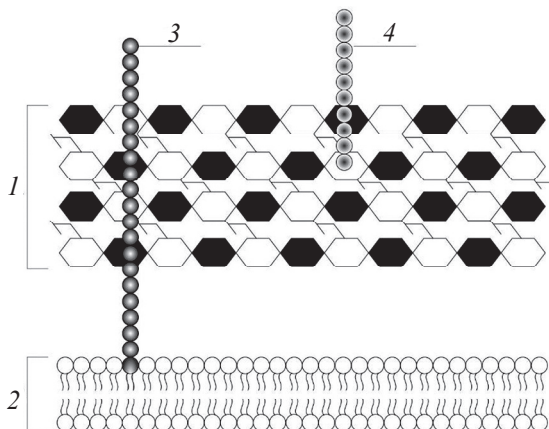


Рис. 5. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий:

- 1 – слои пептидогликана (муреина) – полимера N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных аминокислотными мостиками;
- 2 – цитоплазматическая мембрана; 3 – липотейхоевые кислоты;
- 4 – тейхоевые кислоты

Грамотрицательные бактерии имеют сложно устроенную, но более тонкую клеточную стенку. В ней выделяют внешнюю мембрану, периплазматическое пространство, слой пептидогликанов и другие компоненты (липополисахариды, белки, фосфолипиды), в зависимости от вида бактерии (рис. 6). При окраске анилиновыми красителями с йодом клеточная стенка также прокрашивается, но теряет свою окраску при обработке спиртом.

Особняком стоят кислотоустойчивые бактерии, которые, по Граму, не окрашиваются либо окрашиваются слабо. Эти бактерии обладают наиболее сложно устроенной клеточной стенкой (рис. 7). В ее составе – до 40 % воска и другие липиды. Для того чтобы окрасить эти бактерии, применяют специальный метод окраски по Цилю –

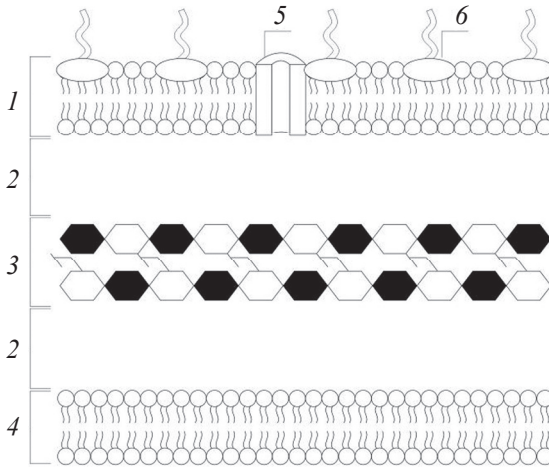


Рис. 6. Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий:
 1 – внешняя мембрана; 2 – периплазматическое пространство;
 3 – тонкий слой пептидогликана; 4 – цитоплазматическая мембрана;
 5 – порины; 6 – липополисахариды

Нильсену с применением фенолового фуксина Циля. Суть этого метода состоит в существенном повышении температуры в процессе приготовления препарата. При такой температуре липиды в клеточной стенке кислотоустойчивых бактерий растворяются, и клетка окрашивается. В дальнейшем при остывании препарата липиды восстанавливают свою структуру, и при отмывке концентрированной серной кислотой или солянокислым спиртом бактерия окраску не теряет. На последнем этапе препарат дополнительно красится метиленовым синим для окраски сторонней микрофлоры или клеток и тканей макроорганизма (в клинической практике).

При дифференцированной окраске микроорганизмов окрашивается не вся клетка в целом, а отдельные ее части – капсула, клеточная стенка, нуклеоид, включения с различным содержанием.

Некоторые из бактерий способны образовывать покоящиеся формы – споры. Спорообразующие бактерии довольно распространены в природе, что неудивительно – способность переживать высокие температуры и обезвоживание является их преимуществом.

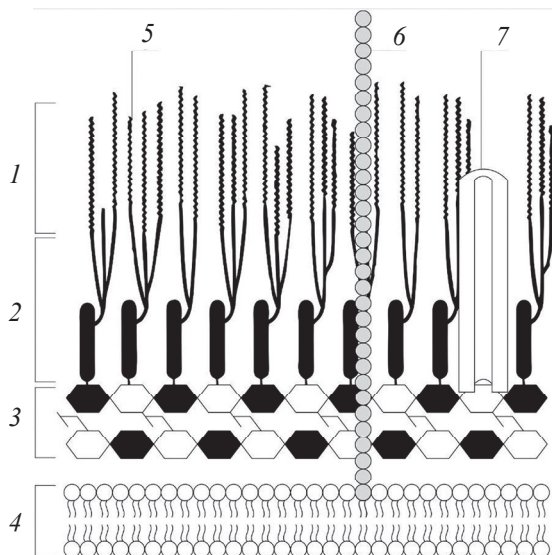


Рис. 7. Структура клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий:

- 1 – миколовые кислоты; 2 – арабиногалактан; 3 – пептидогликан;
 4 – цитоплазматическая мембрана; 5 – гликолипиды; 6 – липоарабидоманнан;
 7 – порин

Различают эндо- и экзоспоры в зависимости от способа их образования. Эндоспоры образуются внутри клетки, а экзоспоры – снаружи, отпочковываясь от клетки. Окрашивать эндоспоры возможно несколькими методами, например, они слабо окрашиваются метиленовым синим и фуксином Циля. Для более четкого прокрашивания применяют методы с нагреванием (вплоть до кипения) красителя (окраска спор и цитоплазмы по Пешкову или Шеферу – Фулто-ну). В таком случае хорошо прокрашиваются и клетка, и спора, но при последующей отмывке краситель вымывается из клетки, оставаясь в споре. Основывается этот метод на тех же принципах, что и окраска по Цилю – Нельсону.

В данной работе опасность представляют феноловый фуксин Циля, серная кислота и использование спиртовки для нагревания препаратов. Во избежание несчастных случаев все правила техники безопасности и протоколы проведения окрасок должны соблю-

даться неукоснительно. Из двух предложенных окрасок эндоспор нужно выбрать и сделать одну.

Цель работы: сформировать у студента представления о сложных методах окраски бактерий и практические навыки работы в этой области.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.
5. Фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло.
6. Источник микроорганизмов – культуры грамположительных (*Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*), грамотрицательных (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*), кислотоустойчивых (*Mycobacterium b5*) и спорообразующих бактерий (*Clostridium*, *Bacillus*).
7. Реактивы для окраски по Граму: свежий генциановый фиолетовый, свежий реактив Люголя для окраски по Граму, водный раствор фуксина или сафранина, 95% спирт.
8. Реактивы для окраски по Цилю – Нильсену: феноловый фуксин Циля, метиленовый синий, 5–10 % раствор H_2SO_4 .
9. Реактивы для окраски эндоспор по Пешкову: метиленовый синий, 0,5 % раствор сафранина.
10. Реактивы для окраски эндоспор по Шеферу – Фултону: 0,5 % водный раствор малахитового зеленого, 0,5 % раствор сафранина.

З а д а н и е 1

Окраска по Граму

На предметное стекло нанести культуры грамположительных организмов (*Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*) с одной стороны и грамотрицательных (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*) – с другой. Приготовить фиксированный окрашенный препарат (см. лабораторную работу № 2).

Поместить предметное стекло в штатив для окрашивания. Накрыть мазок фильтровальной бумагой и нанести генциановый фиолетовый на 1 мин.

Убрать бумагу и слить остатки красителя, не промывая водой. Нанести на препарат раствор Люголя на 1,5–2 мин. до потемнения мазка.

Слить раствор Люголя, аккуратно промыть препарат водой.

На 15–20 сек. поместить предметное стекло мазком в раствор 95 % спирта, вынимая его каждые 5 сек.

Аккуратно промыть препарат от спирта водой.

Не высушивая препарат, нанести на мазок водный раствор фуксина (сафранина) на 45 сек.

Смыть краситель и аккуратно промыть препарат водой.

Высушить препарат и микроскопировать его с иммерсионным объективом.

На препарате отметить грамположительные (сине-фиолетовые) и грамотрицательные (красно-розовые) клетки бактерий. В рабочую тетрадь внести описание процесса окраски по Граму, его теоретические основы и получившиеся результаты.

З а д а н и е 2

Окраска по Цилю – Нильсену

На предметное стекло внести культуры кислотоустойчивых организмов (*Mycobacterium b5*) с одной стороны и некислотоустойчивых (любые другие) – с другой. Приготовить фиксированный окрашенный препарат (см. лабораторную работу № 2).

Поместить предметное стекло в штатив для окрашивания. Накрыть образец фильтровальной бумагой, залить карболовым фуксином Циля.

Взять препарат пинцетом. РАВНОМЕРНО разогревать всю поверхность предметного стекла над пламенем спиртовки до появления паров (пары наблюдать со стороны!), затем остудить и добавить красителя, если необходимо. Повторить трижды.

Убрать фильтровальную бумагу. Аккуратно поместить препарат в раствор серной кислоты на 1 мин., после этого промыть водой.

Не высушивая препарат, нанести на него метиленовый синий на 1 мин., после чего промыть водой.

Высушить препарат и микроскопировать его с иммерсионной системой.

Кислотоустойчивые бактерии окрасятся в насыщенно-красный цвет, а некислотоустойчивые – в синий. В рабочую тетрадь внести описание процесса окраски по Цилию – Нельсону, его теоретические основы и получившиеся результаты.

З а д а н и е 3

Окраска эндоспор по Пешкову

Приготовить фиксированный окрашенный препарат спорообразующих бактерий (*Clostridium*, *Bacillus*).

Накрыть мазок фильтровальной бумагой, залить раствором метиленового синего по Леффлеру. С помощью пинцета взять препарат и, РАВНОМЕРНО нагревая все стекло с помощью спиртовки, довести краситель до кипения. Окрашивать 10 сек. с момента закипания красителя.

Аккуратно положить препарат на штатив и охладить.

Тщательно, но аккуратно отмыть его водой до обесцвечивания стекающей воды.

Окрасить препарат сафранином в течение 30 сек.

Слить второй краситель и вновь промыть водой.

Высушить и микроскопировать препарат с иммерсионной системой.

Споры прокрасились при температурной обработке и не обесцветились при отмывке водой, соответственно, они должны быть синего цвета, клетки – красного. В рабочую тетрадь внести описание процесса окраски эндоспор по Пешкову, его теоретические основы и получившиеся результаты.

З а д а н и е 4

Окраска эндоспор по Шеферу – Фултону

Приготовить фиксированный окрашенный препарат спорообразующих бактерий (*Clostridium*, *Bacillus*).

Накрыть мазок фильтровальной бумагой, залить раствором маляхитового зеленого. Взять препарат пинцетом и, равномерно нагревая все стекло с помощью спиртовки, добиться появления паров.

Аккуратно положить препарат на штатив и охладить.

Тщательно, но аккуратно отмыть его водой до обесцвечивания стекающей воды.

Окрасить препарат сафранином в течение 30 сек.

Слить второй краситель и вновь промыть водой.

Высушить и микроскопировать препарат с иммерсионной системой.

Споры прокрасились при температурной обработке и не обесцветились при отмывке водой, соответственно, они должны быть зеленого цвета, клетки – красного. В рабочую тетрадь внести описание процесса окраски эндоспор по Шеферу – Фултону, его теоретические основы и получившиеся результаты.

Вопросы для самоподготовки

1. На чем основывается метод окраски бактерий по Граму?
2. За счет чего кислотоустойчивые клетки получили такое название?
3. Какова функция эндоспор у бактерий? Какие еще покоящиеся формы бактерий существуют?

Лабораторная работа № 4

Количественный учет микроорганизмов

Основные теоретические положения

Во многих сферах микробиологии количественный учет микроорганизмов не менее важен, чем качественный. Это касается как почвенной или водной микробиологии, так и медицинской. Во всех случаях необходимо оценить бактериальную нагрузку чего-либо микроорганизмами: в первом случае для того, чтобы сделать экологическое описание той или иной среды, а во втором – чтобы оценить степень заражения и назначить адекватную терапию.

Оценивать количество микроорганизмов можно различными способами:

– *прямым подсчетом* различными методами (в камере Горяева, методом Виноградского – Брида, на мембранных фильтрах, капиллярным методом);

– *косвенными методами*, основанными на разведении суспензии клеток и высевом их на питательные среды (методом Коха)

и на расчете различных показателей, изменяющихся в зависимости от количества микроорганизмов (оптическая плотность в нефелометрическом методе).

В данной работе необходимо будет проанализировать суспензию клеток дрожжей и сравнить четыре метода подсчета микроорганизмов – два прямых метода (в камере Горяева и методом Виноградского – Брида) и два косвенных – метод Коха и нефелометрический метод.

Обычно в исследуемой среде клеток слишком много и для прямых, и для косвенных методов подсчета микроорганизмов, поэтому ее разводят в несколько раз и работу ведут с серией разведений.

Прямые методы

Камера Горяева – особое предметное стекло с нанесенной на него микроскопической сеткой (рис. 8). Подсчет клеток в камере Горяева осуществляется в больших или малых квадратах сетки в зависимости от размеров микроорганизмов (рис. 9). Сетка нанесена на поверхность стекла, расположенного строго на 0,1 мм ниже, чем соседние площадки. Они используются для притирания специального толстого покровного стекла к камере. Образование радужных колец (колец Ньютона) в месте площадок говорит о том, что притирание прошло успешно и объем камеры соответствует заявленному.

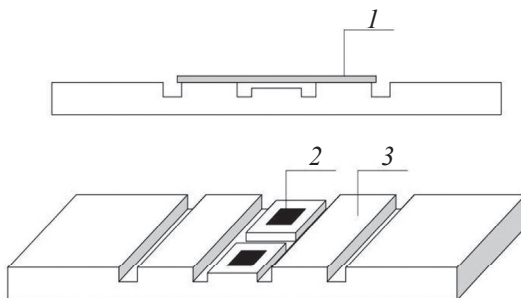


Рис. 8. Камера Горяева:

1 – покровное стекло; 2 – микроскопическая сетка;
3 – площадки для притирания стекла

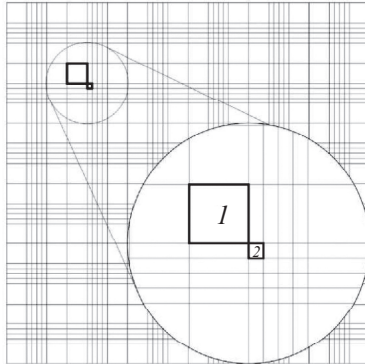


Рис. 9. Сетка камеры Горяева:

1 – большой квадрат сетки; 2 – малый квадрат сетки

Метод Виноградского – Брида заключается в подсчете микроорганизмов на фиксированных окрашенных мазках в полях зрения. Для этого на предметном стекле с помощью миллиметровой бумаги вычерчивают прямоугольник с определенной площадью и готовят фиксированный окрашенный мазок суспензии клеток известного объема по площади этого прямоугольника. Подсчет производят в полях зрения, предварительно высчитав их площадь (обычно с помощью объект-микросметра).

Два этих метода являются прямыми методами подсчета. На каждое разведение необходимо подсчитать не менее 600 клеток.

Метод подсчета клеток *на мембранных фильтрах* используется для количественного учета микроорганизмов с низкими плотностями клеток. Определенный объем пробы исследуемого субстрата отделяют через фильтры с определенным размером пор, а затем окрашивают и подсчитывают клетки с помощью микроскопа с окулярной сеткой.

Косвенные методы

Нефелометрический метод. Те же самые разведения, которые использовались при прямых методах подсчета, будут использованы для измерения оптической плотности с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) и составления калибровочной кривой. Построение

графика по соотношению данных прямого подсчета микроорганизмов с данными ФЭК позволяет получить формулу для перевода этих данных в количество микроорганизмов. В дальнейшем подобная формула позволяет существенно экономить время и исследовать культуры клеток только на ФЭК, минуя прямые методы подсчета.

Метод Коха основан на посеве определенного объема трех конечных разведений на три чашки Петри с питательной средой. В конечных разведениях клеток должно быть не очень много, чтобы каждая из них образовывала изолированную колонию, но и не очень мало (если колоний на чашке Петри будет меньше десяти, то этот результат нельзя использовать для подсчета). Каждая изолированная колония – потомство одной клетки, что позволяет соотнести количество выросших колоний с количеством клеток. Для равномерного распределения клеток обычно используют шпатель Дригальского.

Цель работы: освоить различные методы количественной оценки микроорганизмов и возможности их сопоставления.

Оборудование и реактивы

1. Суспензия культуры дрожжей.
2. Пробирки для разведения культуры со стерильной водопроводной водой.
3. Чашки Петри со средой Сабуро для выращивания дрожжей.
4. Стерильные шпатели Дригальского, 3 шт. на группу.
5. Камеры Горяева.
6. Миллиметровая бумага, предметные стекла.
7. Спиртовки и зажигалки.
8. Микроскопы.
9. Объект-микрометр.
10. ФЭК, кюветы к нему, стерильная чистая среда для контроля.
11. Фильтровальная бумага, вата, хозяйственное мыло.
12. Самплеры и стерильные наконечники к ним.

Задания 1 и 2 данной работы выполняются единожды на всю группу и в ламинарном боксе.

З а д а н и е 1

Приготовление серии разведений исходной суспензии (табл. 1)

Приготовить 7 пробирок с 5 мл стерильной воды в каждой.

Подписать пробирки (1–7).

В пробирку № 1 внести 5 мл исходной суспензии, перемешать саплером и *сменить наконечник*.

В пробирку № 2 внести 5 мл из пробирки № 1, перемешать саплером и *сменить наконечник*.

Каждый раз с помощью нового наконечника проделывать ту же процедуру с оставшимися пробирками.

Важно! Нельзя погружать кончик наконечника слишком сильно в раствор, откуда производится забор материала.

Т а б л и ц а 1

**Серия разведений культуры
*Saccharomyces cerevisiae***

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Разведение (раз)	2	4	8	16	32	64	128

З а д а н и е 2

Посев на чашки Петри для подсчета методом Коха

В асептических условиях пипеткой внести 50 мкл суспензии из пробирки № 7 на чашку Петри, распределить по ней этот объем с помощью стерильного шпателя Дригальского. Подписать чашку Петри: видовое название, разведение, дата, группа.

Повторить процедуру с пробирками № 5 и 6. Сразу их подписать. Поставить чашки Петри в термостат на 37 °С.

Подсчитать количество выросших колоний на следующем занятии и вычислить количество клеток в исходной суспензии по формуле:

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

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятой для посева; 10^n – коэффициент разведения.

Внести данные в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Среднее количество клеток в исходной суспензии

№ пробы	Разведение	Среднее количество клеток в исходной суспензии, высчитанное			
		Камера Горяева	Метод Виноградского – Брида	Нефелометрический метод	Метод Коха
–	Исходное				
1	2				
2	4				
3	8				
4	16				
5	32				
6	64				
7	128				

З а д а н и е 3

Подсчет клеток в камере Горяева

Притереть покровное стекло к предметному до появления радужных колец на местах притирки. Появление колец Ньютона означает, что объем камеры в таком положении точно равен занятому.

Внести каплю суспензии под покрывное стекло капилляром или самплером.

Микроскопировать с объективом $\times 40$ или $\times 20$. Подсчитывать все клетки микроорганизмов, находящиеся внутри большого квадрата, а также на пограничных линиях, если они большей частью находятся в данном квадрате. Клетки, большая часть которых находится в другом квадрате, не подсчитываются. Если клетки пересекаются пограничной линией пополам, то их считают только на двух смежных сторонах квадратов, например, на левой и нижней.

Подсчитать необходимо не менее 600 клеток для каждого разведения. Для этого придется посмотреть и приготовить не один препарат. Всю информацию заносить в тетрадь.

После подсчета около 600 клеток необходимо подсчитать среднее количество клеток в большом квадрате сетки и подставить результат в формулу подсчета общего количества клеток в 1 мл суспензии по формуле:

$$M = \frac{1000 \cdot a}{h \cdot S} \cdot n,$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее число клеток в большом квадрате сетки; n – коэффициент разведения суспензии; h – глубина камеры; S – площадь квадрата сетки.

Глубина камеры и площадь квадрата сетки (или объем камеры) указаны на самой камере. Не забыть также внести эти данные в тетрадь.

З а д а н и е 4

Подсчет клеток методом Виноградского – Брида

Чистое обезжиренное предметное стекло помещается на фильтровальную бумагу, на которой уже был размечен прямоугольник площадью 4 см².

На стекло вносится 10 мкл суспензии культуры и тщательно распределяется по площади прямоугольника.

После высыхания препарата его фиксируют, окрашивают 30 сек. метиленовым синим, промывают, причем не проточной водой, а погружением в сосуды с водой, и вновь подсушивают.

Препарат микроскопируют на объективе $\times 20$ или $\times 40$, подсчитывая число клеток в поле зрения. Для достоверности результатов подсчет должен вестись не менее чем в 50 полях зрения.

Для подсчета площади поля зрения используется объект-микроскоп. С его помощью высчитывают диаметр и по формуле площади круга узнают площадь поля зрения.

После окончания подсчетов необходимо вычислить количество микроорганизмов в исследуемом растворе по формуле:

$$M = \frac{a \cdot S}{s \cdot V} \cdot n,$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; a – среднее количество клеток в поле зрения; S – площадь мазка (мм^2); s – площадь поля зрения (мм^2); V – объем нанесенной на стекло суспензии (мл); n – коэффициент разведения исходной суспензии.

З а д а н и е 5

Подсчет микроорганизмов нефелометрическим методом

Параметры использования ФЭК: $h = 540$ нм, кювета с длиной оптического пути 0,5 см, в качестве контроля использовать стерильную среду.

Промерить на ФЭК оптическую плотность суспензий из пробирок с серией разведений. Наливать суспензии до риски, не касаясь граней кюветы. Промывать дистиллятом перед каждым новым замером.

Занести данные в тетрадь.

З а д а н и е 6

Построение калибровочной кривой

От каждой группы требуется таблица формата *Excel*. На первом листе должны быть собраны первичные данные: фамилия, используемый метод подсчета, данные.

На втором листе – среднее число клеток в большом квадрате сетки или в поле зрения по каждому разведению.

На третьем листе должна быть приведена таблица (см. табл. 2). В ней необходимо указать среднее количество клеток в исходной суспензии, высчитанное *Excel* по указанным формулам для каж-

дого разведения, и среднее количество клеток в исходной суспензии по каждому методу.

Предварительно необходимо построить график зависимости оптической плотности суспензии дрожжей от их количества, на котором должны присутствовать линия тренда и формула этой зависимости.

В этом же файле написать вывод о проделанной работе, провести сравнительный анализ методов количественного учета микроорганизмов.

Вопросы для самоподготовки

1. В чем заключается цель количественного учета в микробиологии?
2. В чем разница между прямыми и косвенными методами учета?
3. Опишите практическое значение калибровочной кривой.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В этот блок входит последовательность лабораторных работ по выделению и описанию чистой культуры бактерий, посвященных выполнению следующих задач: приготовление питательных сред и оборудования, постановка накопительной культуры, выделение чистой культуры, идентификация бактерий. Студенты должны распределиться по бригадам, в которых они будут работать практически до конца семестра. При выполнении лабораторной работы № 5 каждая бригада выбирает номер группы микроорганизмов, с которой будет работать. Конечной целью является идентификация этой группы на основании всех полученных данных. Также в этот же блок заданий были включены работы по санитарной микробиологии и определению чувствительности бактерий к антибиотикам*.

Лабораторная работа № 5

Приготовление питательных сред и оборудования, их стерилизация

Основные теоретические положения

Выращивание микроорганизмов – основа всей микробиологии, поэтому правильный подбор и подготовка среды – крайне важный навык. Существует несколько классификаций сред.

1. По консистенции:

– *Жидкие среды* готовятся добавлением в воду (дистиллированную или водопроводную) различных органических и неорганических веществ. Исторически такой тип сред был первым способом

* При подготовке заданий этого раздела были использованы методические разработки, представленные в «Практикуме по микробиологии», см.: *Петрусов А. И.* Практикум по микробиологии : учеб. пособие для вузов. М. : Академия, 2005. 608 с.

выращивания микроорганизмов. До сих пор жидкие среды используются во многих аспектах микробиологии.

– *Полужидкие среды* получают путем добавления в жидкую среду 0,5 % агара.

– *Твердые питательные среды*. Первым их начал применять в широкой практике Р. Кох. Твердые питательные среды получают путем добавления загустителей (уплотнителей) к жидким средам. В качестве загустителей служат агар-агар, желатин и силикагели. *Агар* – сложный полисахарид, состоящий из смеси агарозы и агаропектина и получаемый из бурых и красных водорослей. Вследствие некоторых своих особенностей он занял лидирующее положение среди остальных загустителей. К числу таких преимуществ можно отнести относительно высокую температуру плавления (95–100 °С), неспособность большинства микроорганизмов использовать его в качестве питательного субстрата и относительную дешевизну. Агар добавляют в концентрации от 1,5 до 3 %. *Желатин* – продукт неполного гидролиза белка коллагена, выделяемого из кожи, костей и хрящей животных. Также используется в качестве загустителя, но гораздо реже по причинам низкой температуры плавления (25–30 °С) и большого количества микроорганизмов, обладающих протеолитической активностью и, соответственно, разлагающих желатин. *Силикагель* – неорганическое вещество, представляющее собой высушенные перенасыщенные растворы кремниевых кислот. Так как органических веществ этот загуститель не содержит, его используют преимущественно для выращивания хемолитоавтотрофов.

– *Сыпучие питательные среды* используются в микробиологической промышленности для хранения культур микроорганизмов. Чаще всего в качестве сыпучих сред выступают отруби или кварцевый песок, пропитанные раствором питательной среды.

2. По природе компонентов:

– *Натуральные питательные среды* состоят исключительно из продуктов естественного происхождения – крови, молока, овощных, дрожжевых или мясных отваров. Натуральные среды отличаются широким спектром веществ в своем составе, универ-

сальностью, но у них есть существенные недостатки – невозможно точно установить их качественный или количественный состав. Таким образом, нельзя их использовать для изучения метаболизма микроорганизмов.

– *Полусинтетические питательные среды* получают добавлением различных синтетических компонентов к вышеперечисленным натуральным средам.

– *Синтетические питательные среды* состоят исключительно из точных навесок заранее известных и чистых органических и/или неорганических веществ. Состав подобных сред всегда точно известен, их возможно использовать для изучения метаболизма. Кроме этого, некоторые микроорганизмы растут преимущественно именно на синтетических средах.

3. По назначению:

– *Универсальные питательные среды* используются для выращивания широкого спектра микроорганизмов. Если сам микроорганизм не требователен к составу питательных сред, то он стабильно будет расти на универсальных питательных средах. Подобные питательные среды чаще всего являются также натуральными по своему составу.

– *Эктивные питательные среды* используются для выделения культур микроорганизмов из естественных ниш. Своим составом они благоприятствуют одним микроорганизмам и препятствуют росту других. Таковой средой является среда Эшби, используемая для выращивания азотфиксирующих бактерий. Так как сама среда не содержит в себе источника азота, то только бактерии, способные фиксировать его из атмосферы, способны расти на ней.

– *Дифференциально-диагностические питательные среды* используют в медицинской и санитарной микробиологии для видового/родового определения микроорганизмов среди узкого спектра патогенных, условно-патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов. Дифференциация происходит на основе их метаболизма. Среда подбирается таким образом, чтобы при росте определенного микроорганизма изменялась рН и, соответственно, менялся цвет индикатора, добавленного в среду. Такой средой является,

например, агар Клиглера, который способен дифференцировать пять видов различных микроорганизмов по их способности ферментировать глюкозу и лактозу, выделять газ и сероводород.

Питательная среда должна содержать в себе *источник энергии, источник углерода, источник азота*, а также для некоторых бактерий *факторы роста*. Те бактерии, которые могут самостоятельно синтезировать все необходимое для собственного роста, называют *прототрофами*. Бактерии, требующие для своего существования определенных факторов роста, называют *ауксотрофами*. В качестве факторов роста могут выступать отдельные аминокислоты, витамины, пурины, пиримидины и др.

Как уже описывалось ранее, в основе всей микробиологической практики находится стерильность условий работы. Создание асептических условий – необходимое требование для правильной работы в микробиологических лабораториях. Существует множество способов обеспечить подобные условия.

1. Термическая стерилизация (методы, основанные на высоких температурах):

– *Фламбирование* – обработка рабочего инструмента в пламени. Подобным образом обрабатываются микробиологические петли, иглы, шпатели, горлышки посуды непосредственно перед работой. Фламбирование происходит в верхней, самой горячей части пламени.

– *Обработка сухим жаром* (180 °С, 2 ч) в сухожаровых шкафах. Применяется для пустой стеклянной и фарфоровой посуды, термостойчивых порошков.

– *Автоклавирование* – обработка насыщенным паром под давлением. Осуществляется в специальных приборах – автоклавах, в которых создается дополнительное давление, позволяющее проводить обработку паром температурой выше 100 °С. Чаще всего для стерилизации в микробиологической практике используют температуры от 112 до 135 °С. Для этого в автоклавах создается дополнительное давление в 0,5–1,5 ати (атмосферы избытка). Автоклавирующим стерилизуют в первую очередь микробиологические среды. Прежде чем стерилизовать колбы со средами, необходимо их

правильно упаковать – подобрать пробку, закрепить ее, подписать колбу. Количество среды в колбе не должно превышать треть ее объема. Таким образом, 100 мл среды следует стерилизовать в колбе объемом 250 мл.

– *Тиндализация* – особый способ температурной стерилизации сред и различных веществ, которые нельзя стерилизовать при температурах выше 100 °С. Тиндализацию осуществляют текучим паром в кипятильниках Коха или в незакрытых автоклавах. Обработку проводят в течение 10–15 мин., после чего среды на сутки ставят в благоприятные условия – в термостат при 30 °С. В это время споры, которые выжили при обработке текучим паром, прорастают, становясь вегетативными клетками. Спустя сутки процедуру повторяют. Проведя весь цикл несколько раз, можно добиться полного исчезновения спор.

– *Пастеризация* – однократное нагревание объекта стерилизации до 60–70 °С в течение 10–15 мин. Подобный метод не позволяет избавиться от спор микроорганизмов и стерильности не обеспечивает. Пастеризацию используют в тех случаях, когда объект не выдерживает нагревания выше 70–80 °С. Чаще всего пастеризацию используют для вина, пива, молока и т. д.

– *Кипячение* используется редко для стерилизации металлического и стеклянного инструмента в течение 30–40 мин.

2. Холодная стерилизация (без повышения температуры):

– *Стерилизации химическими веществами* чаще всего подвергаются поверхности, и реже – инструмент. В качестве дезинфицирующих средств может выступать множество соединений – хлорсодержащие, спирты, ПАВ, третичные амины, соединения серебра, перекисные соединения и многое другое. Для каждого дезинфицирующего средства есть свои режимы обработки и другие особенности.

– *Стерилизации газообразными веществами* подвергается лабораторная посуда, не выдерживающая высоких температур – вся посуда из термолабильного пластика, например. Стерилизация осуществляется в специальных приборах, посуду также необходимо корректно упаковать. В качестве стерилизующих газов используют оксид этилена, формальдегид, озон.

– *Стерилизации облучением* подвергаются в первую очередь помещения, рабочее место (в ламинарном боксе) и поверхности. Стерилизацию проводят с помощью ультрафиолетового излучения, и реже – некоторых других его видов.

– *Стерилизация фильтрованием* применяется для тех соединений, которые не выдерживают даже небольшого нагревания. В качестве бактериальных фильтров используют соединения с размерами пор не более 0,7 мкм. Особенное распространение получили мембранные фильтры на основе нитроцеллюлозы.

Цель работы: изучить с теоретической и практической точек зрения подготовительный этап микробиологической работы – приготовление и стерилизацию питательных сред и оборудования, а также особенности культивирования микроорганизмов.

Оборудование и реактивы

1. Чашки Петри, пробирки, штативы к ним, шпатели.
2. Газеты/бумага для упаковки, ватные пробки.
3. Реактивы: *Nutrient Broth* (мясопептонный бульон), мочевины, сахароза, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, K_2SO_4 , $CaCO_3$, глюкоза, агар, сусло.
4. Весы, кисточки, шпатели.
5. Автоклав, сухожаровой шкаф.

Ход работы

1. На каждую бригаду упаковать четыре чашки Петри, шпатели для стерилизации.
2. На бригаду приготовить среды в зависимости от выбранного номера.
3. В рабочую тетрадь оформить отчет с краткой теорией, номером бригады, составом и количеством собранной среды (как в г/л, так и пересчитанной). Показать отчет преподавателю.

Состав среды указан в граммах на литр, также указано, сколько пробирок/колб и какого объема необходимо приготовить. В первую очередь необходимо произвести расчет того, сколько, чего и в какой посуде необходимо приготовить. Нужно обратить внимание на то, что в большинстве случаев требуются как жидкие,

так и твердые питательные среды. Указывается состав жидкой среды, для получения твердой среды необходимо добавить 2 % агара.

Nutrient Broth – готовая коммерческая среда, представляющая собой высушенный мясопептонный бульон.

Б р и г а д а 1

Среда (г/л): *Nutrient Broth* – 13, мочевины – 100 (отсутствие в составе агара говорит о том, что среда эта жидкая!).

Приготовить две пробирки по 5 мл жидкой среды в каждой.

Среда (г/л): *Nutrient Broth* – 13, мочевины – 20, агар – 20.

Приготовить колбу на 250 мл со 100 мл агаризованной среды.

Приготовить две пробирки с 5 мл агаризованной среды в каждой.

Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки также закрыть ватными пробками, поставить в штатив.

Б р и г а д а 2

Среда (г/л): сахароза – 20, K_2HPO_4 – 0,2, $MgSO_4$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, $CaCO_3$ – 5,0, агар – 20,0.

Приготовить две колбы на 250 мл со 100 мл и две пробирки с 5 мл среды.

Упаковать две дополнительные чашки Петри.

Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки поставить в штатив и также упаковать в газету.

Б р и г а д ы 3 и 4

Среда: *Nutrient Broth* – 6,5 г в 500 мл воды смешать с 500 мл сула, агар – 20 г.

Приготовить колбу на 250 мл со 100 мл среды и две пробирки с 5 мл среды в каждой.

Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки также закрыть ватными пробками и поставить в штатив.

Б р и г а д а 5

Среда (г/л): *Nutrient Broth* – 13

Приготовить две колбы на 100 мл с 30 мл среды в каждой. Отсутствие в составе агара говорит о том, что среда эта жидкая!

Среда (г/л): *Nutrient Broth* – 13, агар – 20.

Приготовить две пробирки с 5 мл агаризованной среды.

Колбы закрыть ватными пробками и упаковать в газету, пробирки также закрыть ватными пробками и поставить в штатив.

Б р и г а д а 6

Среда 5 (г/л): *Nutrient Broth* – 13, агара – 20, глюкозы – 20.

Приготовить колбу на 250 мл со 100 мл агаризованной среды.

Приготовить две пробирки с 5 мл агаризованной среды. Приготовить чистую колбу на 100 мл.

Приготовить для стерилизации три колбы на 50 мл. Закрыть их ватными пробками и упаковать в газету, пробирки поставить в штатив и также упаковать в газету.

Вопросы для самоподготовки

1. Что входит в понятие «холодные методы стерилизации»?
2. В чем разница между прототрофами и ауксотрофами?
3. Какие загустители сред используются в микробиологии?

Лабораторная работа № 6

Получение накопительных культур микроорганизмов

Основные теоретические положения

Чистая культура – популяция микроорганизмов на питательной среде (жидкой или твердой), представленная клетками одного вида. Это основной тип культур, с которыми имеет дело микробиология. Они позволяют изучать морфологические, биохимические, генетические и другие свойства исключительно одного вида микроорганизмов, пусть даже понятие «вид» по отношению к бактериям является весьма расплывчатым. Чистые культуры – исключительно продукт деятельности человека, в естественных условиях они не встречаются. В любой экологической нише, будь то почва, водоем или какая-либо поверхность, существует несколько, а чаще всего огромное множество видов микроорганизмов. Процесс выде-

ления чистых культур достаточно хорошо известен и рутинен для известных видов бактерий. При выделении чистой культуры из естественных условий необходимо пройти стадию накопительной культуры.

Накопительная культура – популяция нескольких видов микроорганизмов, выращенных в определенных элективных (селективных, накопительных) условиях. Элективные условия благоприятствуют существованию необходимой группы микроорганизмов и/или препятствуют росту остальных.

Под элективными условиями в каждом конкретном случае понимается разное. Такими условиями могут быть в первую очередь источник углерода (CO_2 для автотрофов, C1-соединения для метилотрофов), источник энергии (свет как единственный источник энергии для фотосинтетиков) и отношение к молекулярному кислороду (в присутствии кислорода будут развиваться только аэробы). Кроме этого, в качестве элективных факторов используются pH (молочнокислые бактерии могут расти и при pH = 4, уробактерии – при pH = 9), температура (для термофилов и спорообразующих бактерий), концентрации различных веществ в среде.

Большое значение для успешного выделения физиологической группы бактерий имеет источник посевного материала. Если среда, откуда выделяются бактерии, уже обогащена искомой группой, то это облегчит выделение. В качестве примера можно привести Mn-окисляющие бактерии – они широко распространены в почве, но проще их будет выделить из образцов глубоководных осадков марганца.

Эта лабораторная работа – вторая в большом цикле работ по выделению и описанию культуры бактерий. На предыдущем занятии были приготовлены питательные среды и посуда для работы. На этом занятии необходимо выполнить задание под тем же номером, что и на предыдущем. Практически в каждой работе необходимо соблюдать условия стерильности – прокалывать рабочий инструмент, обжигать горлышко пробирки или колбы, в которую вносится посевной материал.

Цель работы: изучить понятия «накопительная культура» и «чистая культура», приобрести навыки выделения накопительных культур из естественных субстратов.

Оборудование и реактивы

1. Приготовленные среды (см. лабораторную работу № 5).
2. Посевной материал (почва, сено, картофель, навоз, пиво).
3. Пробирки, колбы, чашки Петри.
4. Микробиологические петли, шпатели Дригальского, капилляры, шпатели.
5. Кипящая водяная баня.

Ход работы

Б р и г а д а 1

1. В асептических условиях инокулировать (внести посевной материал) небольшим количеством навоза две подготовленные пробирки с жидкой средой.
2. Пробирки плотно закрыть ватными пробками и прогреть на кипящей водяной бане в течение 20 мин.
3. Подписанные пробирки (день и пара практики, номер бригады, дата) поставить на 7 дней в термостат (30 °С).

Б р и г а д а 2

1. Расплавить 100 мл среды из одной колбы объемом 250 мл.
2. Разлить среду по трем чашкам Петри, дать ей остыть и застыть.
3. В асептических условиях, используя стеклянный капилляр, смоченный в воде, разложить маленькие комочки почвы по чашке Петри в количестве 25–35 шт.
4. Подписать чашки Петри (день и пара практики, номер бригады, дата) и поставить в термостат (30 °С) на 7 дней.

Б р и г а д а 3

1. Поместить 1 г сена в колбу объемом 100–150 мл, залить 30 мл воды, настаивать в течение 30 мин.
2. Аккуратно слить сенной настоей, не допуская попадания сена, и разлить в две пробирки, плотно закрыть их ватными пробками.
3. Подержать на кипящей водяной бане в течение 20 мин.
4. Подписать пробирки (день и пара практики, номер бригады, дата) и поставить в термостат (30 °С) на 7 дней.

Б р и г а д а 4

1. Неочищенный картофель нарезать на мелкие ломтики, поместить их в колбу объемом 100 мл и залить водой наполовину.
2. Добавить CaCO_3 на кончике шпателя, плотно закрыть ватной пробкой.
3. Прогреть на кипящей водяной бане в течение 20 мин.
4. Подписать колбу (день и пара практики, номер бригады, дата) и поставить в термостат (30°C) на 7 дней.

Б р и г а д а 5

1. В асептических условиях добавить по 0,3 г почвы в каждую колбу на 100 мл с 30 мл среды, закрыть ватной пробкой.
2. В асептических условиях смочить лакмусовую бумажку стерильным дистиллятом, подвесить ее между средой и пробкой, не касаясь среды.
3. В асептических условиях смочить фильтровальную бумагу раствором ацетата свинца и подвесить таким же образом, не касаясь самой среды.
4. Подписать колбы (день и пара практики, номер бригады, дата) и поставить в термостат (30°C) на 7 дней.

Б р и г а д а 6

1. В три колбы объемом 50 мл влить 24, 22 и 20 мл непастеризованного пива.
2. Добавить 1, 3 и 5 мл 5 % столового уксуса соответственно, закрыть ватными пробками.
3. Подписать колбы (день и пара практики, номер бригады, дата) и поставить в термостат (30°C) на 7 дней.

Вопросы для самоподготовки

1. Своими словами дайте определение понятию «накопительная культура».
2. Своими словами дайте определение понятию «чистая культура».
3. Какие условия могут выступать в качестве элективных для выделения накопительных культур?

Лабораторная работа № 7

Получение чистых культур микроорганизмов

Основные теоретические положения

Следующим этапом является получение чистых культур. С технической точки зрения, существует множество способов выделения чистой культуры, их используют в зависимости от свойств самих выделяемых бактерий. Но в основе всех методов лежит единый принцип – получение чистой культуры из одной изолированной колонии. Все клетки колонии на твердых питательных средах представляют собой клоны – потомство одной единственной клетки, поэтому подобные колонии очень удобно использовать.

Если планируется выделение чистой культуры из жидкой питательной среды, то лучше воспользоваться методом Дригальского (рис 10). Для этого нужны стерильный шпатель Дригальского, три (обычно) чашки Петри со средой и непосредственно источник микроорганизмов. Техника посева следующая:

1. В стерильных условиях приготовить три чашки Петри с твердой средой (расплавить, разлить, остудить).

2. Самплером со стерильным наконечником или стерильной пипеткой внести небольшой объем накопительной культуры или любого другого источника микроорганизмов.

3. Аккуратно, стараясь не повредить агар, стерильным шпателем Дригальского распределить суспензию по всей поверхности среды.

4. Этим же шпателем так же аккуратно и равномерно протереть поверхность твердой среды во второй чашке Петри, затем в третьей.

5. Подписать чашки Петри, перевернуть вверх крышками, чтобы конденсат не мешал росту изолированных колоний, и поместить в термостат на необходимую температуру.

6. Спустя некоторое время (в зависимости от конкретного случая) на твердой среде вырастут изолированные колонии. Чаще всего это происходит на третьей чашке Петри.

7. В стерильных условиях производится пересев данной колонии на скошенный агар для проверки чистоты выделенной культуры.

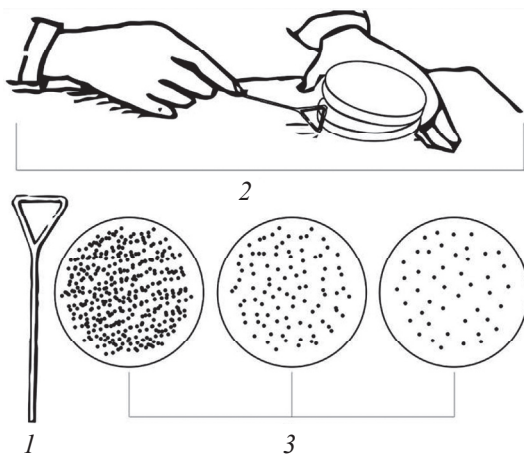


Рис. 10. Выделение чистой культуры по методу Дригальского:

1 – шпатель Дригальского; 2 – техника распределения клеток;
3 – результат посева

Другой способ выделения чистой культуры – метод истощающего штриха с использованием обычной микробиологической петли. *Техника посева:*

1. В стерильных условиях приготовить одну чашку Петри с твердой средой (расплавить, разлить, остудить).

2. В асептических условиях отобрать исследуемую культуру петлей и в несколько параллельных штрихов в одном направлении распределить отобранный материал.

3. Прокалить петлю в пламени докрасна и остудить.

4. Провести серию однонаправленных штрихов стерильной петлей в другом направлении (рис. 11).

5. Снова прокалить петлю, остудить и провести серию штрихов, также поменяв направление.

6. Повторить цикл.

7. Подписать чашку Петри, перевернуть крышкой вверх и поставить в термостат. Спустя некоторое время в области четвертой группы штрихов появятся изолированные колонии, а в остальных областях, скорее всего, сплошной «газон».

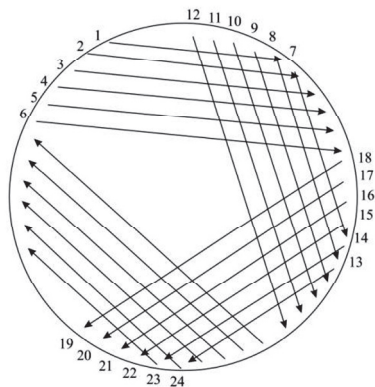


Рис. 11. Выделение чистой культуры методом истощающего штриха

Нередко приходится пересевать подобными методами колонии микроорганизмов несколько раз с целью выделить чистую культуру. Два вышеописанных способа наиболее технологически просты и подходят лишь для аэробов. Чистые культуры микроаэрофилов и факультативных аэробов получают методом глубинного посева, когда разведения накопительной культуры или другого посевного материала вносятся вглубь столбика агаризованной питательной среды. Сложнее обстоит дело с анаэробными бактериями; для выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов существуют особые техники.

Кроме этого, существуют и методы получения чистых культур с помощью специальных приборов – микроманипуляторов и микроселекторов или же с помощью капельного метода.

Цели работы: понять принципы и освоить различные способы получения чистых культур микроорганизмов.

Оборудование и реактивы

1. Колбы с приготовленными на лабораторной работе № 5 средами.
2. Накопительные культуры, поставленные на лабораторной работе № 6.
3. Стерильные шпатели.

4. Предметные и покровные стекла.
5. Микроскопы.
6. Микробиологические петли.
7. Вата и фильтровальная бумага.
8. Спиртовки, зажигалки.

Ход работы

1. Внести в рабочую тетрадь подробное внешнее описание полученной накопительной культуры – мутность, цвет, запах, цвет индикаторов (если есть), форма колоний (если есть).

2. Подготовить препарат «раздавленная капля» с полученной культурой, отметить в тетради морфотипы и подвижность клеток.

3. Приготовить в асептических условиях чашки Петри с агаризованной средой (по бригадам). Для этого расплавить среду в колбе и в ламинарном боксе разлить ее на три чашки Петри.

4. Одним из вышеописанных способов в асептических условиях провести рассев полученной накопительной культуры на твердую питательную среду.

5. Оформить отчет по лабораторной работе в рабочей тетради. Внести в него описание обоих способов получения чистых культур и указать принцип, лежащий в их основе.

Вопросы для самоподготовки

1. На каких принципах построено выделение чистых культур микроорганизмов?
2. Для чего требуется выделять чистые культуры?
3. Какими способами необходимо подтвердить чистоту выделенной культуры?

Лабораторная работа № 8

Определение и описание чистой культуры

Основные теоретические положения

После получения чистой культуры первое, что необходимо сделать – проверить ее чистоту.

Анализ нужно проводить по нескольким параметрам:

- однородность роста бактерий по поверхности скошенной агаризованной среды;
- однородность морфологии выросших колоний;
- однородность морфологии клеток (за исключением некоторых полиморфных бактерий, то есть тех, чья форма варьирует в известных пределах).

Кроме того, необходимо высевать чистую культуру на питательные среды различного состава, который отличается для разных бактерий. Естественно, разделение основывается на метаболизме. Чистоту культуры автотрофов необходимо проверять на средах без полиуглеродных соединений. Также ее можно проверить и отрицательным отбором – высеять исследуемую культуру на ту среду, на которой она расти не должна, и убедиться в отсутствии роста.

Когда есть уверенность в чистоте выделенной культуры, можно приступать к ее описанию. Необходимо указать морфологические и биохимические параметры колоний и клеток бактерий (табл. 3). В большинстве случаев этого будет недостаточно для определения бактерии до вида или даже до рода, что связано со сложностями в систематике бактерий.

Существует два возможных подхода к систематике бактерий: исторически первый – фенотипическая систематика Д. Берджи, а также филогенетическая систематика. В 1923 г. вышло первое издание «Определителя бактерий Берджи», с тех пор он модифицировался и переиздавался множество раз. В основе данной классификации лежат морфологические, физиологические и биохимические особенности бактерий и архей. В фенотипической систематике Берджи среди всех прокариот выделяются четыре категории на основе строения их клеточной стенки – имеющие клеточную стенку грамположительные эубактерии, имеющие клеточную стенку грамотрицательные эубактерии, эубактерии, не имеющие клеточной стенки и архебактерии. Дальнейшее дробление этих категорий происходит не на основе родственных связей бактерий, а исключительно на их общих фенотипических свойствах. На втором

уровне систематики бактерий Берджи выделяют 35 групп на основе отношения к кислороду, формы клеток, их подвижности и способности образовывать особые структуры (чехлы, эндоспоры, плодовые тела и т. д.).

Для более точного определения (до рода или вида) необходимо в первую очередь провести множество биохимических тестов – на способность бактерии утилизировать различные углеводы, белки, липиды; на наличие или отсутствие некоторых ферментов; на условия культивирования и т. д. Например, для дифференциации медленнорастущих бактерий рода *Mycobacterium* до вида необходимо проверить наличие пяти ферментов, рост при 25 и 45 °С, способности к гидролизу твина, восстановлению нитратов, накоплению никотиновой кислоты, фотохромогенность, скотохромогенность, устойчивость к действию восьми различных веществ. Таким образом, видно, что использование подобной системы для идентификации бактерий громоздко и требует множества времени, сил и ресурсов. Тем не менее, до изобретения и массового использования секвенирования это был единственный достоверный способ идентификации бактерий.

Второй вариант систематики бактерий и архей – филогенетическая систематика, основанная на изучении эволюционных взаимоотношений различных таксономических групп организмов между собой. Иными словами, цель филогенетики – выяснить филогенетические связи, то есть то, как давно данные виды (или другие таксоны) разошлись на эволюционном древе. Появлению подобной системы предшествовало множество накопленных в молекулярной биологии знаний (строение ДНК, центральная догма молекулярной биологии) и в эволюции (синтетическая теория эволюции, молекулярные часы), а также новые технические возможности (выделение ДНК, ПЦР, секвенирование по Сэнгеру). Для идентификации микроорганизма в филогенетической систематике требуется выделить ДНК, секвенировать ген 16S-rРНК и расположить полученную последовательность на эволюционном древе, сравнив с уже известными геномами из баз данных.

Данная лабораторная работа рассчитана на два занятия. По ее итогам бригадой сдается отчет: описываются приготовление питательных сред, постановка накопительной культуры, ее свойства, выделение чистой культуры, ее характеристика и идентификация бактерий.

Цель работы: описать полученную чистую культуру различными способами и определить до физиологической группы/рода/вида ее принадлежность.

Оборудование и реактивы

1. Микроскоп, иммерсионное масло.
2. Предметные стекла, штатив к ним.
3. Спиртовки и зажигалки.
4. Микробиологические петли.
5. Фильтровальная бумага и вата.
6. Выделенная чистая культура бактерий.
7. Реактивы для окраски по Граму: свежий генциановый фиолетовый, свежий реактив Люголя, водный раствор фуксина или сафранина, 95 % спирт.
8. Реактивы для окраски по Цилю – Нельсону: феноловый фуксин Циля, метиленовый синий, 5–10 % раствор H_2SO_4 .
9. Реактивы для окраски эндоспор по Пешкову: метиленовый синий.
10. Красители: водный раствор сафранина, метиленовый синий, тушь.

Ход работы

1. Проверить частоту выделенной культуры. В стерильных условиях пересеять полученную чистую культуру с чашки Петри на скошенный агар. Для этого нужно прокалить и остудить петлю и, работая рядом с пламенем спиртовки, приоткрыть чашку Петри, отобрать бактерии с изолированной колонии, закрыть чашку Петри.

Открыть пробирку, обжечь горлышко, опустить петлю на дно пробирки и, поднимаясь вверх, распределить бактерии по поверхности скошенного агара (рис. 12).

Обжечь горлышко пробирки, закрыть ватной пробкой, прокалить петлю. Подписать пробирку (день и пара практики, номер бригады, дата), поставить в термостат (30 °С).



Рис. 12. Техника посева на скошенный агар

2. Охарактеризовать колонию – указать ее размер, форму самой колонии, ее края и профиля, текстуру, пигментацию и т. д. Заполнить соответствующие графы табл. 3. Справочный материал указан в рис. 13–15.

Т а б л и ц а 3

Описание полученной культуры

Признак	Описание
<i>Описание колонии</i>	
Форма	
Профиль	
Край	
Размер	
Цвет	
Поверхность	
Блеск	
<i>Морфология клеток</i>	
Форма, расположение	
Подвижность	
Окраска по Граму	

Окончание табл. 3

Признак	Описание
Окраска по Цилю – Нильсену	
Эндоспоры	
Капсулы	
<i>Биохимические свойства</i>	
Каталаза	
Оксидаза	

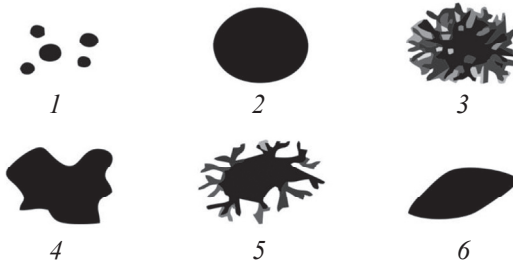


Рис. 13. Форма колоний:

1 – точечная; 2 – круглая; 3 – нитчатая; 4 – нерегулярная;
5 – ризоидная; 6 – веретеновидная

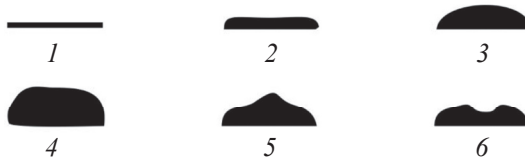


Рис. 14. Форма профиля колонии:

1 – плоская; 2 – приподнятая; 3 – выпуклая; 4 – подушкообразная;
5 – с выпуклостью; 6 – блюдцевидная

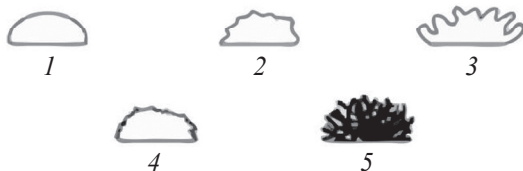


Рис. 15. Форма края колонии:

1 – целый; 2 – волнистый; 3 – лопастной; 4 – выемчатый; 5 – нитчатый

3. Закончить заполнение табл. 3. Для этого приготовить в соответствии с уже известными протоколами следующие препараты:

– Препарат бактерий, окрашенных по Граму. Отметить как непосредственно окраску по Граму, так и размер, форму и сочетание клеток.

– Препарат бактерий, окрашенных по Цилю – Нильсену. Отметить кислотоустойчивость/некислотоустойчивость исследуемых клеток.

– Препарат бактерий, окрашенный на эндоспоры. Отметить наличие или отсутствие эндоспор.

– Препарат бактерий, окрашенный на капсулы. Отметить наличие или отсутствие капсул.

– Живой препарат бактерий. Отметить подвижность/неподвижность клеток.

4. Изучить биохимическую активность исследуемых бактерий на примере тестов на наличие каталазы и оксидазы.

Наличие каталазы определяется внесением суспензии исследуемой культуры микробиологической петлей в асептических условиях в каплю 3 % перекиси водорода на предметном стекле. Если через 1–5 мин в капле начинают образовываться пузырьки газа, то бактерии являются каталаза-положительными.

Наличие оксидазы определяется внесением суспензии исследуемой культуры бактерий на фильтровальную бумагу, смоченную раствором свежеприготовленного 1 % раствора солянокислого тетраметил-*n*-фенилендиамина. Если в течение минуты после внесения бактерий развивается фиолетовая окраска, то бактерии являются оксидаза-положительными.

5. Воспользовавшись определителем бактерий Берджи и полученными данными, попробовать определить группу бактерий, род или даже вид (в редких случаях). В некоторых случаях возможно определить только физиологическую (экологическую) группу бактерий. Внести в табл. 3 результат идентификации бактерий с доказательствами. Указать также физиологическую группу бактерий, выделенную на этапе накопительной культуры, и те тесты, которые необходимо было бы провести, чтобы более точно определить бактерии. Сделать и записать вывод о проделанной работе.

Вопросы для самоподготовки

1. На каких принципах базируется фенотипическая систематика?
2. В чем особенности филогенетической систематики?
3. Какая систематика в настоящее время активнее используется в научном мире и почему?

Лабораторная работа № 9

Санитарная микробиология

Основные теоретические положения

Санитарная микробиология – раздел медицинской микробиологии, который занимается изучением микрофлоры различных объектов окружающей среды и их влиянием на организм человека, а также прямой и косвенной оценкой загрязненности окружающей среды микробиологическими объектами. Данная наука стоит на границе медицинской микробиологии, эпидемиологии, гигиены, пищевой микробиологии.

Важно! Так как в данной работе могут быть получены культуры патогенных бактерий, после посева пробирки и чашки Петри закрываются и изолируются парафильмом. Никакая дальнейшая работа с культурами не ведется, после считывания визуальных результатов культуры автоклавируются.

Объекты исследования санитарной микробиологии:

- Различные поверхности – пол, потолок, стены; рабочая поверхность, поверхность кожи и т. д.
- Вода питьевая, техническая, водопроводная и т. д.
- Почва.
- Пищевые продукты.
- Слизистые оболочки людей (в особенности медицинского персонала).

Санитарная микробиология базируется на ряде принципов.

Принцип взятия проб. Они должны быть отобраны в стерильных условиях и быстро доставлены в лабораторию. Условия, в которых они транспортируются, не должны быть ни благоприятными для размножения микроорганизмов, ни приводящими к их гибели. Для таких целей существуют специальные консервирующие (транспортные) среды.

Принцип повторности анализов. Дело в том, что микроорганизмы (как патогенные, так и санитарно-показательные) распространены в окружающей среде неравномерно. В связи с этим необходимо отбирать несколько проб из одного места и серию проб из разных мест исследуемого объекта. Кроме этого, состав микроорганизмов может изменяться со временем, поэтому из одного и того же объекта нужно отбирать пробы в различное время.

Принцип стандартности. Вся санитарная микробиология построена на стандартных методиках, прописанных во множестве нормативных документов (ГОСТ, СанПиН, МУК). Все процедуры требуется проводить, неукоснительно следуя нормам и правилам для корректного анализа, а также для возможности корректного сравнения результатов с известными показателями.

Принцип комплексности. Нельзя судить о загрязненности объекта только по результатам одного теста. Необходимо проводить несколько разнообразных исследований как для качественного, так и для количественного анализа исследуемого объекта.

Все методы санитарной микробиологии можно подразделить на *прямые*, при которых находят непосредственно патогенные микроорганизмы или их токсины, и *косвенные*, при которых находят

санитарно-показательные микроорганизмы, служащие индикаторами микробиологического загрязнения среды. В силу того, что патогенные микроорганизмы приспособлены к проживанию внутри организма-хозяина и слабо приспособлены (большинство) к условиям внешней среды, прямые методы исследования не могут дать полноценный ответ.

Для удобства работы в санитарной микробиологии выделяют группу *санитарно-показательных микроорганизмов* (СПМ). В нее включаются условно-патогенные микроорганизмы, входящие в состав нормальной микрофлоры и в норме выделяющиеся во внешнюю среду различными способами. Сами по себе эти микроорганизмы для людей с нормальной иммунной системой опасности не представляют. Однако, в отличие от патогенных микроорганизмов, они способны дольше сохраняться во внешней среде и служить индикаторами микробиологического загрязнения объекта. То есть чем больше находят СПМ в среде, тем вероятнее ее загрязнение патогенными микроорганизмами.

К СПМ первой группы относят бактерии группы кишечной палочки (БГКП, колиморфные бактерии) – *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и другие представители семейства *Enterobacteriaceae*. Наличие бактерий этой группы свидетельствует о фекальном загрязнении исследуемого объекта. Кроме этого, наличие грамположительных клеток бактерий рода *Enterococcus* свидетельствует о недавнем фекальном загрязнении, так как эти бактерии во внешней среде погибают достаточно быстро.

К СПМ второй группы относят стафилококки, зеленающие стрептококки (альфа-гемолиз), гемолизирующие стрептококки (бета-гемолиз) и несколько других. Все эти микроорганизмы выделяются во внешнюю среду из верхних дыхательных путей и носоглотки человека. Наличие бактерий данной группы является показателем воздушно-капельного загрязнения исследуемого объекта.

К третьей группе СПМ относят протей (*Proteus*), термофилы, нитрификаторы. Все эти микроорганизмы не являются составляющей микрофлоры человека, но учитывать их наличие и количество

во внешней среде необходимо, так как они являются показателями загрязнения разлагающимися органическими субстратами.

Существует множество *косвенных методов оценки загрязнения окружающей среды микроорганизмами*.

ОМЧ [*КОЕ/мл*, *КОЕ/г*, *КОЕ/м³*] – общее микробное число – это количество «всех» микроорганизмов в 1 мл жидкости или 1 г твердого вещества. Высчитывают это число простым подсчетом выросших колоний на мясопептонном агаре (МПА). Естественно, в подобных условиях растут не все микроорганизмы, в среде реально содержащиеся, а лишь аэробные либо факультативно-анаэробные мезофильные бактерии, способные расти на МПА. Но именно подобные бактерии и представляют интерес для санитарной микробиологии.

Титр – это наименьший объем/масса исследуемого образца, в котором содержится хотя бы одна клетка СПМ.

Индекс – количество СПМ в 1 л (воздуха/жидкостей) или в 1 г твердого образца. Это показатель, обратный титру.

Для определения СПМ существуют специализированные дифференциально-диагностические среды (д.-д.). Подобные среды содержат в себе индикатор, меняющий цвет среды при изменении рН (что происходит вследствие метаболизма определенных бактерий). Кроме того, дифференциальными признаками могут выступать газообразование или образование сероводорода. Для выделения каждой конкретной группы микроорганизмов существует огромное количество дифференциально-диагностических сред. В качестве примера будет рассмотрен агар Клиглера–д.-д. среда для идентификации энтеробактерий по их способности ферментировать (сбраживать) глюкозу, лактозу, а также по их способности образовывать газ и сероводород. Рост различных микроорганизмов и их признаки указаны в табл. 4. Таблица взята из инструкции к готовой коммерческой среде.

Цель работы: освоить основные методы санитарной микробиологии, принципы их работы, изучить основные показатели микробиологической загрязненности окружающей среды.

Рост различных бактерий на агаре Клиглера*

Тест-штамм	Скос	Столбик	Газ	H ₂ S
<i>Citrobacter freundii</i>	Ж	Ж	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Ж	Ж	+	–
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ж	Ж	+	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ж	Ж	+	–
<i>Proteus vulgaris</i>	К	Ж	–	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	К	Ж	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	К	Ж	+	–
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	К	Ж	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	К	Ж	–	+
<i>Shigella flexneri</i>	К	Ж	–	–

* Ж – желтый цвет, К – красный цвет.

Оборудование и реактивы

1. Готовые стерилизованные дифференциально-диагностические питательные среды: МПА, агар Эндо, стафилококковый (солевой) агар, агар Кесслера, агар Клиглера, среда Сабуро.
2. Стерильные зонды для отбора проб.
3. Стерильные емкости для отбора воды.
4. Термостат.

Ход работы

1. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха.

Чашки Петри с МПА открыть и оставить на час, желательно на уровне сидящего или стоящего человека. Под воздействием гравитации бактерии и частицы, их содержащие, оседают на поверхности питательной среды.

Чашки закрыть и поставить в термостат на 37 °С на сутки. По истечении суток можно также поставить чашки на вторые сутки в термостат с температурой 25 °С.

Подсчитать количество выросших колоний. Если их менее 250, воздух считается чистым, при количестве колоний от 250 до 500 – умеренно загрязненным, и при количестве колоний более 500 – загрязненным.

Для сравнительного анализа можно одновременно исследовать воздух в различных помещениях.

2. Санитарно-бактериологическое исследование воды.

Произвести отбор материала в стерильные емкости с прикрепленной стерильной запасной крышкой. Взять пробы водопроводной воды после предварительной стерилизации поверхности крана и десятиминутного пропуска воды. Воду из открытых водоемов берут с глубины 10–15 см от поверхности и 10–15 см от дна.

Определить ОМЧ воды посевом в две чашки Петри с МПА двух объемов воды (например, 0,1 и 0,01 мл) в зависимости от ее предполагаемой загрязненности. Посев следует производить в расплавленную и остуженную до 45–50 °С среду. После посева среду необходимо тщательно перемешать. Среды поместить в термостат (37 °С) на сутки, после чего подсчитать количество появившихся колоний и определить ОМЧ воды. Питьевая вода является чистой при ОМЧ меньше 100.

3. Санитарно-бактериологическое исследование смывов.

Произвести отбор проб с помощью стерильных одноразовых зондов или самодельных увлажненных стерильных тампонов. Для изучения подойдет любая поверхность – руки, телефоны, ручки дверей, унитазы, рабочие поверхности и т. д.

Сразу после забора материала его следует засеять на питательные среды. В данном случае можно пользоваться как чашками Петри, так и скошенным агаром. Выбор сред для исследования также ничем не ограничен – МПА, солевой агар для выявления бактерий рода *Staphylococcus*; агар Эндо, агар Клиглера, цитратный агар Симмонса и многие другие для выявления и идентификации энтеробактерий; среда Сабуро с теллуридом калия для выявления грибов.

Засеянные чашки Петри и пробирки инкубировать в термостате в течение суток при температуре 37 °С. После этого выросшие колонии идентифицировать в зависимости от конкретной среды.

4. Оформление отчета.

В отчет необходимо включить теоретические аспекты санитарной микробиологии, методику отбора проб, методику анализа и полученные результаты.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое санитарно-показательные микроорганизмы и какими свойствами они обладают?
2. Для чего в современном обществе нужна санитарная микробиология?
3. Какие принципы лежат в основе забора проб при исследованиях в рамках санитарной микробиологии?

Лабораторная работа № 10

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

Основные теоретические положения

История антибиотиков началась в XX в. Первыми обнаружил антибактериальные свойства экстрактов плесневых грибов итальянец Винченцо Тиберио, но его открытие не приняли во внимание. Первооткрывателем первого антибиотика пенициллина считается Александр Флеминг. Свое открытие он сделал фактически случайно в 1928 г., но не смог выделить достаточно чистый пенициллин. Только в 1940–1941 гг. Эрнсту Чейзу и Говарду Флори удалось выделить чистый пенициллин в достаточном количестве и успешно пролечить пациента. После этого производство пенициллина было поставлено на поток, а ученые по всему миру стали искать вещества, обладающие подобными свойствами. В 1945 г. Флемингу, Чейзу и Флори была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины за открытие пенициллина и его целебного воздействия при различных инфекционных болезнях.

Массовое применение пенициллина во Вторую мировую войну и позже спасло миллионы жизней. Но вскоре обнаружилось, что

бактерии способны приобретать устойчивость к антибиотикам. Особенности генетической системы бактерий, способность к горизонтальному переносу генов и неконтролируемый прием антибиотиков людьми привели к быстрому распространению устойчивых к антибиотикам возбудителей различных заболеваний. И до сих пор продолжается «гонка вооружений» между учеными, ищущими новые антибиотики и модифицирующими старые, и бактериями, успешно к этим антибиотикам приспособляющимися. Именно поэтому вопрос о методах определения чувствительности бактерий к антибиотикам очень актуален.

Обычно данные методы используются для достижения двух целей:

– Определение чувствительности клинических изолятов для назначения адекватной антибиотикотерапии.

– Определение чувствительности музейных штаммов и клинических изолятов для тестирования перспективных противомикробных препаратов.

Антибиотиками в классическом смысле называют вещества природного происхождения, способные в малых концентрациях подавлять рост микроорганизмов или вызывать их гибель. Также существуют синтетические антибактериальные средства, отличающиеся от антибиотиков происхождением. Как видно из определения, антибиотики могут обладать *бактериостатическим* (подавлять рост микроорганизмов) и *бактерицидным* (вызывать гибель микроорганизмов) действием.

Антибиотики классифицируют по механизму действия следующим образом:

– Подавляющие синтез клеточных стенок бактерий – бета-лактамы (пенициллины, цефалоспорины), гликопептиды (ванкомицин).

– Нарушающие функции цитоплазматической мембраны – полимиксины.

– Нарушающие синтез белка – аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, фениколы.

– Подавляющие синтез нуклеиновых кислот – фторхинолоны, сульфаламиды.

Основной целью определения чувствительности является выявление минимальной ингибирующей (подавляющей) концентрации антибиотика – МИК (МПК). Методы определения чувствительности к антибиотикам подразделяют на несколько групп:

1. *Диффузные*, основанные на миграции антибактериального препарата, обычно с твердотелой фазы на питательные среды с бактериями.

– *Метод дисков*. На твердую среду в чашке Петри вносят определенный объем бактериальной культуры (обычно соответствующий 0,5 стандарту мутности по МакФарланду, что равно $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл). Затем помещают на поверхность этой среды диски с известными концентрациями раствора антибиотика. Далее происходит диффузия антибиотика в агар. Если бактерия чувствительна к такой концентрации данного антибиотика, то ее рост останавливается, то есть вокруг диска образуется зона подавления роста микроорганизмов (рис. 16). Чем она больше, тем большей эффективностью обладает антибиотик. Отсутствие зоны подавления роста говорит о полной резистентности данного штамма микроорганизма к конкретной концентрации исследуемого антибиотика.

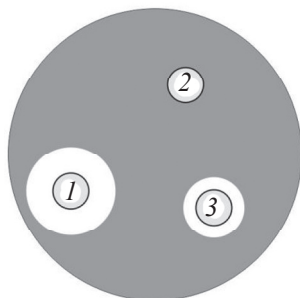


Рис. 16. Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотику:

1 и 3 – зоны подавления роста микроорганизма;
2 – отсутствие зоны подавления роста

E-тесты основаны на том же принципе, что и метод дисков, разница лишь в том, что на один отрезок бумаги нанесены антибиотики с возрастающей концентрацией. Рост бактерий вокруг зоны

с низкой концентрацией антибиотика ничем не ограничен, но по мере приближения к высоким концентрациям из-за диффузии антибиотика в агар зона роста эллипсоидно уменьшается (рис. 17). В месте окончания зоны роста, то есть ее пересечения с полоской E-теста, находится минимальная ингибирующая концентрация данного антибиотика к данному изоляту бактерий.

E-тесты используются только для выяснения чувствительности неизвестных изолятов к известным антибиотикам. В отличие от диско-диффузионного метода, их можно купить только в готовом виде с уже нанесенным антибиотиком.

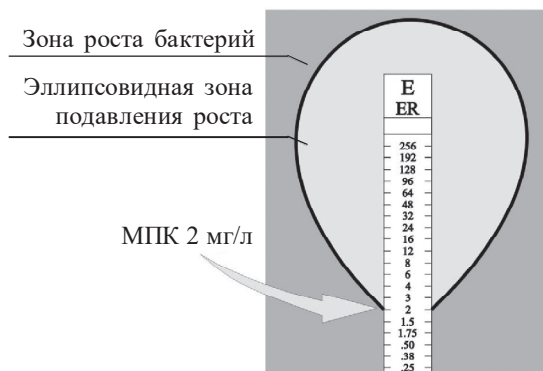


Рис. 17. Метод E-тестов

2. *Методы разведения*, основанные на последовательном разведении раствора исследуемого вещества и исследовании его действия на жидкие или твердые культуры микроорганизмов. В случае с жидкими культурами готовят серию разведений антибиотика в питательной среде, после чего в эту питательную среду вносят суспензию культуры клеток (обычно соответствующую стандарту мутности 0,5 МакФарланда). Среды инкубируют сутки при 37 °С и смотрят на их помутнение. При его наличии делают вывод, что данная концентрация антибиотика неэффективна против данного штамма микроорганизма. Первая же незамутненная пробирка указывает на минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика.

Цель работы: освоить различные методы выявления чувствительности к антибиотикам.

Оборудование и реактивы

1. Стерильные растворы антибиотиков.
2. Чашки Петри с питательной средой.
3. Пробирки с жидкой стерильной питательной средой.
4. Стерильные бумажные диски.
5. Культуры грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Ход работы

1. Приготовление стандарта мутности 0,5 по МакФарланду. Приготовить 0,5 мл BaCl_2 в концентрации 0,048 моль/л (1,175 % раствор $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Перемешивая, медленно добавить 99,5 мл раствора 0,18 моль/л (1 %) H_2SO_4 до получения однородного раствора.

Проверить правильность приготовления раствора на спектрофотометре: кювета 1 см, длина волны 625 нм. В таких условиях поглощение должно составлять 0,08–0,1.

Разлить полученный раствор по 5 мл в пробирки с плотно закрывающимися крышками во избежание испарения. Пробирки должны быть такого же диаметра, как и те, в которых будет находиться суспензия исследуемой культуры.

2. Установление чувствительности диско-диффузионным методом.

В асептических условиях равномерно рассеять суспензию исследуемой культуры по поверхности чашек Петри. Следует использовать инокулом, соответствующий по оптической плотности 0,5 по стандарту МакФарланда. В контрольной чашке Петри без добавления антибиотиков через сутки должен вырасти «газон» – культура должна покрыть всю поверхность питательной среды.

Стерильным пинцетом поместить диски с различными концентрациями антибиотиков на поверхность чашек Петри. Диски не должны располагаться ближе 20 мм от края чашки. Их следует аккуратно прижать пинцетом к поверхности агара и не перемещать после нанесения.

Перевернуть чашки Петри и инкубировать их в термостате при 35 °С сутки.

На следующий день просмотреть чашки Петри на наличие зон отсутствия роста бактерий вокруг дисков, сравнить с контрольными образцами. Измерить диаметр этих зон, занести данные рабочую тетрадь.

Построить график зависимости диаметра зоны отсутствия роста бактерий от концентрации антибиотика, рассчитать МИК. Внести данные в табл. 5.

Т а б л и ц а 5

МИК определенных антибиотиков для бактерий

Бактерия	Антибиотик	МИК (метод дисков)	МИК (метод разведений)
<i>E. coli</i>	Ампициллин		
	Рифампицин		
	Бензилпенициллин		
<i>Bacillus spp.</i>	Ампициллин		
	Рифампицин		
	Бензилпенициллин		

2. Установление чувствительности методами разведения.

Приготовить серию разведений рабочего раствора антибиотика в питательной среде. Для этого сэмплером добавить 0,5 мл исходного раствора антибиотика к 0,5 мл жидкой питательной среды, тщательно перемешать, поменять наконечник и повторить процедуру со следующей пробиркой. Из последней пробирки 0,5 мл следует удалить.

Приготовить суспензию культуры клеток, эквивалентную 0,5 по стандарту мутности МакФарланда.

В асептических условиях инокулировать каждую пробирку с питательной средой и антибиотиком 0,5 мл изготовленной суспензии.

Инкубировать пробирки в термостате при 37 °С 18–24 ч. Поставить отрицательный контроль для каждого антибиотика и хранить его в холодильнике при +4 °С.

Каждую пробирку визуально на свету сравнить с контрольной, хранившейся в холодильнике. Отметить МИК данного антибиотика по отношению к данному штамму бактерии по отсутствию видимого помутнения среды, внести данные в таблицу (табл. 5).

По результатам работы написать отчет.

Вопросы для самоподготовки

1. В чем причины появления бактерий, устойчивых к антибиотикам?
2. Какими действиями по отношению к бактериям обладают антибиотики?
3. Что такое Е-тест?

ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Современная микробиология тесно взаимодействует с биотехнологией и генетикой. В частности, бактерии являются широко используемыми платформами для наработки терапевтических белков, а в свое время эксперименты на кишечной палочке помогли расшифровке генетического кода. Поэтому необходимо познакомить студентов с рядом молекулярно-биологических и биотехнологических манипуляций с модельным организмом *Escherichia coli* (кишечной палочкой).

Лабораторная работа № 11

Выделение и очистка плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Основные теоретические положения

Для бактерий, кроме нуклеоида, характерно также наличие внехромосомных кольцевых ДНК – плазмид. Данные кольцевые молекулы имеют размеры от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч пар оснований. Они способны реплицироваться независимо от деления бактериальной клетки и находятся в ней в количестве от нескольких до нескольких десятков штук. Кроме того, бактерии в ряде случаев способны обмениваться плазмидами друг с другом в процессах трансформации, конъюгации и трансдукции.

Некоторые плазмиды, названные R-плазмидами (R – resistance), несут в себе гены устойчивости к антибиотикам. Обмен плазмидами между патогенными и непатогенными бактериями приводит к появлению и распространению множественной устойчивости к антибиотикам. Особенно это опасно в группе нозомикальных (внутрибольничных) инфекций. Однако способность плазмиды

к независимой репликации, а также обмен плазмидами между клетками делают их удобным инструментом для генной инженерии.

Плазмиды используют в молекулярной генетике в качестве векторов – молекул доставки необходимых исследователю генов в клетку. В дальнейшем это приводит к синтезу гетерологичных белков. Плазида как молекула-челнок в молекулярной биологии обладает несколькими обязательными структурными элементами:

– Точка *ori* – точка начала репликации.

– Сайты рестрикции, служащие для разрезания плазмиды и ее модификации (подробнее об этом см. в лабораторной работе № 15).

– Ген устойчивости к антибиотику, позволяющий проводить селективное выращивание трансформированных клеток на среде с антибиотиком для проверки встраивания плазмиды.

– Маркерный ген (необязательная часть), служащий дополнительным индикатором успешной интеграции плазмиды в клетку. В качестве маркерных генов в последнее время все чаще выступают флуоресцирующие белки – в частности, зеленый флуоресцирующий белок (GFP). Его экспрессия позволяет визуально установить наличие плазмиды в клетке.

– Промотор и находящийся под его контролем целевой ген. Доставка этих двух компонентов в клетку является основной целью всей процедуры.

Выделение ДНК и манипуляции с ней – основа работ в молекулярной генетике. В зависимости от организма, из которого экстрагируется ДНК, выделяют некоторые особенности реактивов и процедур. В любом случае в процессе выделения ДНК необходимо пройти несколько обязательных этапов:

1. Лизис клеток – разрушение клеточной стенки, клеточной мембраны и других возможных оболочек клетки.

2. Депротеинизация клеточного лизата – ферментативное расщепление белков или их осаждение.

3. Центрифугирование в различных растворах для удаления из лизата мешающих компонентов на основе их растворимости.

4. Осаждение ДНК.

5. Очистка ДНК.

6. Растворение ДНК в растворе для хранения, например, в ТЕ-буфере.

Помимо «ручных» методов, существуют методы выделения ДНК с использованием готовых растворов в специальных мини-колонках с сорбентом, селективно связывающим плазмидную ДНК. Такие коммерческие наборы чаще всего создаются для медицинских целей. Выделение ДНК возбудителя и последующая ПЦР с ней – один из самых быстрых способов обнаружить патоген.

Выделение именно плазмидной ДНК основано на том, что при добавлении раствора 2 (см. ниже) рН поднимается до щелочных значений ($\text{pH} \approx 12$), и денатурации подвергается как небольшая плазмидная ДНК, так и крупная нуклеоидная (хромосомная) ДНК. Но крупная хромосомная ДНК денатурирует необратимо вследствие фрагментации ДНК в таких условиях, тогда как ДНК плазмиды при возвращении рН к нейтральным показателям при добавлении раствора 3 (см. ниже) ренатурирует.

Довольно часто количественную и качественную оценку препарату выделенной ДНК в первом приближении дают при гель-электрофорезе, следующем, как правило, сразу за процедурой выделения. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образца с образцом известной концентрации. Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (> 760 нм) областях спектра. Основная зависимость, изучаемая в спектрофотометрии, – зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины. В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера оптическая плотность

раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты поглощают ультрафиолетовое (УФ) излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания нуклеиновой кислоты (НК), особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ-свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин. Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, то есть на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов соответственно. Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше, чем 1,8, значение $A_{260}/235$ – больше, чем 2,2.

Цель работы: научиться выделять внехромосомную ДНК бактерий для последующих рестрикции, электрофореза и трансформации; изучить количество выделенной плазмидной ДНК и ее чистоту.

Оборудование и реактивы

1. Микроцентрифуга.
2. Культура бактерий с плазмидой.
3. pH-метр.
4. Аналитические весы.
5. Вортекс.
6. Реактивы: глюкоза, ЭДТА, додецилсульфат натрия (ДСН, SDS), гидроксид натрия, трис-аминометан, ацетат калия, соляная кислота, лизоцим, изопропанол.
7. Пластиковые микропробирки.
8. Автоматические пипетки и наконечники для них.
9. Микропланшетный спектрофотометр *Tecan M200 Pro*.
10. Микропланшет *Nano Quant*.
11. Марлевые салфетки и вата.
12. Этанол.
13. Дистиллированная вода.
14. Буфер TE.

Ход работы

1. Приготовить растворы для лизиса:
 - Раствор 1 (10 мл): 10 мМ ТрисНСl, рН 7,4, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкозы, 2 мг/мл лизоцима.
 - Раствор 2 (10 мл): 0,2 М NaOH, 1 % SDS.
 - Раствор 3 (10 мл): 3 М ацетат калия.
2. Налить в пробирки типа эппендорф по 100 мкл раствора 1.
Подписать эппендорфы!

3. В стерильных условиях собрать стерильной петлей с чашки Петри небольшое количество бактериальной культуры. Перенести в эппендорф с раствором 1.

ИЛИ

3. Осадить клетки из культуральной среды. Для этого поместить 1,5 мл «ночной культуры» *E. coli* в 1,7 мл микроцентрифужную пробирку и центрифугировать в течение 2 мин при 10 000 об/мин. Удалить супернатант выливанием через край. Повторить осаждение в эту пробирку еще два раза. *Подписать эппендорфы!*

4. Центрифугировать 10 с дополнительно, отобрать остатки культуральной среды микропипеткой. Добавить 100 мкл раствора 1.

5. Ресуспендировать культуру в буфере до образования гомогенной суспензии. Закрывать крышку, 2–3 мин перемешивать гомогенат, переворачивая пробирку в руках. При этом происходит разрушение клеточной стенки под действием лизоцима. Вортекс использовать не рекомендуется.

6. Добавить 200 мкл (двойной объем) раствора 2. Закрывать крышку эппендорфа и аккуратно перемешать легким встряхиванием или перевернуть эппендорф несколько раз. Вортекс использовать не рекомендуется, так как плазмида может порваться.

7. Выдержать 10 мин. при комнатной температуре. Происходят лизис бактерий и щелочная денатурация ДНК.

8. Добавить 150 мкл (1,5 объема) охлажденного раствора 3. Аккуратно перемешать встряхиванием. Оставить на 10 мин в холодильнике при +4 – +8 °С.

9. Поместить эппендорфы в микроцентрифугу, осадить в течение 5 мин. при максимальных оборотах (14 500 об./мин.).

10. Супернатант, содержащий плазмидную ДНК, аккуратно, не задевая осадок, отобрать и перенести в чистую подписанную пробирку.

11. Добавить 1 мл холодного изопропанола. Аккуратно перемешать. Осаждение проводить в течение 1 ч при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

12. Осадить плазмиду центрифугированием в течение 10 мин. при максимальной скорости центрифуги. Супернатант вылить через край, его остатки после короткого центрифугирования отобрать микропипеткой.

13. Добавить 300 мкл 70 % этилового спирта для отмывания осадка от соли. Перемешать и центрифугировать 2 мин. Удалить спирт. Осадок подсушить на воздухе. Нужно избегать пересушивания осадка, так как это снижает его растворимость.

14. Растворить осадок ДНК в 25–50 мкл ТЕ-буфера.

15. Проверить количество и чистоту выделенной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле (10 мкл, лабораторная работа № 12) или на спектрофотометре.

16. Внести в рабочую тетрадь основные принципы выделения ДНК хромосомной и плазмидной.

Спектрофотометрия препаратов ДНК

1. Включить персональный компьютер и спектрофотометр. Кнопка включения прибора находится на задней стенке. Когда прибор включен, на его верхней панели в правом нижнем углу горит зеленый индикатор.

2. Запустить программу *I-control 1–10*. Когда программа загрузится, зайти на панели управления на вкладку *Instrument*, нажать кнопку *Connect* и выбрать в появившемся окне установленную модель прибора. Нажать *OK*. Теперь прибор готов к работе.

3. В нижнем левом углу открывшегося диалогового окна выбрать закладку *Applications*. Автоматически выбрана программа для определения качества и количества нуклеиновых кислот с использованием планшета *Nano Quant*.

4. В выпадающем меню *Type* выбрать тип образца, который нужно проанализировать: деспирализованная геномная ДНК (dsDNA), РНК (RNA), суперспирализованная плазмидная ДНК (ssDNA). Для работы необходим вариант *ssDNA*.

5. Провести калибровку прибора. Для этого взять планшет, снять крышку. Нанести на каждую из лунок по 2 мкл буфера ТЕ и накрыть планшет крышкой. Поставить планшет в прибор, нажав на зеленую кнопку на верхней поверхности спектрофотометра. В диалоговом окне нажать кнопку *Start Blanking*. После завершения калибровки в верхней части диалогового окна кнопка *Start* начнет подсвечиваться зеленым цветом.

6. Подготовить планшет к измерению. Для этого открыть его, стереть сухим ватным тампоном калибровочный буфер, удалить остатки буфера, протерев планшет изнутри тампоном, смоченным в воде, а после – тампоном, смоченным в этаноле. Дать испариться этанолу.

7. Нанести образцы для анализа. Вносить по 2 мкл в лунку, используя новый наконечник для каждого образца. Поместить планшет в прибор, нажать в диалоговом окне кнопку *Start*. Через несколько минут измерение будет закончено, после чего автоматически откроется электронная таблица, в которой будут указаны номер лунки, концентрация нуклеиновых кислот в данной лунке (в нг/мкл, что соответствует мкг/мл), соотношение оптических плотностей при длине волны 260 нм и 280 нм. Это показатель качества и чистоты выделения ДНК. Он должен быть больше, чем 1,8.

8. Очистить планшет от образцов ДНК с помощью ватного тампона, воды и этанола, как указано в п. 6, и убрать его в футляр.

9. Сохранить результаты на флеш-карте, закрыть программу, отключить прибор и компьютер.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие основные участки входят в плазмиду, какие функции они выполняют?
2. Какие стадии выделения ДНК вы знаете? В чем принцип выделения плазмидной ДНК?
3. Какую роль выполняют плазмиды в бактериальной клетке? Как их можно использовать в биотехнологии?
4. Для чего используют фенол и хлороформ при выделении ДНК?
5. Что такое лизоцим? Для чего его добавляют в раствор 1?

Лабораторная работа № 12

Электрофорез плазмидной ДНК в агарозном геле

Основные теоретические положения

Метод электрофореза широко используют в биологии и медицине для разделения заряженных молекул биополимеров – белков и нуклеиновых кислот. Суть метода заключается в том, что заряженные частицы в растворе под действием электрического поля начинают двигаться. При помещении на их пути трехмерных сетчатых структур – гелей (акриламидного, агарозного, крахмального) скорость движения частиц замедляется пропорционально их размеру (массе), что и приводит к их разделению. Более маленькие (а значит, и легкие) молекулы движутся быстрее, чем молекулы большего размера. ДНК – слабая кислота и под действием электрического тока двигается к аноду, заряженному положительно.

На первом этапе электрофореза необходимо приготовить агарозный гель. Готовится он добавлением агарозы в ТАЕ буфер. Для полного растворения агарозы смесь нагревают до 95 °С. Пока гель находится в жидком состоянии, в него добавляют бромистый этидий и разливают в форму, не забывая ставить гребенку для образования лунок. Бромистый этидий впоследствии встроится (интеркалирует) между парами нуклеотидов, что позволит визуализировать ДНК в ультрафиолетовом свете. Очень важна на этом этапе концентрация агарозы. Она может варьировать от 0,3 до 2,0 %. Чем больше концентрация агарозы, тем меньше образующиеся поры и тем меньшего размера молекулы ДНК гель способен разделять.

Следующим этапом электрофоретического разделения является внесение образцов ДНК в лунки. Для этого используют буфер при внесении образцов в гель. Он содержит глицерин или сахарозу, необходимые для того, чтобы ДНК сразу опустилась на дно лунки, и краситель, позволяющий отследить движение электрофоретического фронта. Параллельно с образцами обычно в одну из лунок вносится маркер ДНК – смесь нуклеотидов известной длины (рис. 18). Маркер служит показателем успешности электрофореза.

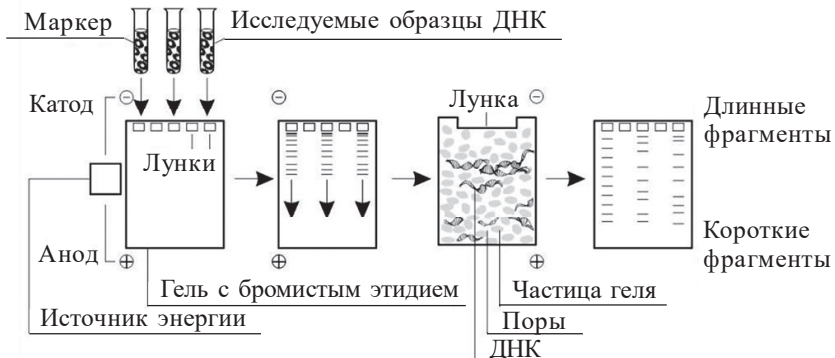


Рис. 18. Процесс электрофореза

После внесения всех образцов в гель включают источник тока, и начинается непосредственно электрофорез. В процессе электрофореза более короткие фрагменты проще проходят через пористую структуру геля и оказываются ближе к аноду (рис. 18).

Конечным этапом работы является визуализация результатов в трансиллюминаторе в УФ-спектре.

Цель работы: освоить метод электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле. Установить качество выделения плазмидной ДНК.

Оборудование и реактивы

1. Буфер для электрофореза – ТАЕ (× 50).
2. Агароза.
3. Бромистый этидий (*Внимание!* Данное вещество является канцерогеном! Работать только в перчатках! Не проливать на стол!).
4. Буфер для внесения с красителем бромфеноловым синим.
5. Камера для горизонтального электрофореза с заливочным столиком.
6. Источник постоянного тока.
7. Электролитка.
8. Автоматическая пипетка с наконечниками.
9. Трансиллюминатор.

Ход работы

1. Приготовить буфер для электрофореза из стока (концентра-та). Для этого взять 20 мл ТАЕ ($\times 50$) и довести дистиллированной водой до 1 л.

2. Приготовить агарозный гель. Для этого взять 1 г агарозы, поместить в коническую колбу объемом 250 мл, добавить 100 мл бу-фера ТАЕ ($\times 1$). Довести буфер до кипения, дождаться полного раст-ворения агарозы. После ее охлаждения до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ добавить 5 мкл раствора бромистого этидия (1 % раствор) и тщательно перемешать.

3. Собрать заливочный столик, выровнять его, поставить греб-бенку.

4. Залить расплавленную агарозу ровным слоем, избегая по-явления пузырьков воздуха.

5. Дождаться полимеризации и остывания геля, аккуратно вы-нуть гребенку. Достать застывший гель из формы, поместить его в электрофоретическую камеру, предварительно заполненную $\times 1$ ТАЕ-буфером.

6. К 5–10 мкл выделенной плазмидной ДНК добавить 0,5–1 мкл буфера, перемешать, аккуратно внести в лунки геля.

7. После внесения образцов закрыть камеру крышкой, подклю-чить электроды к источнику тока.

8. Включить электрический ток, выставив на источнике напря-жение от 60 до 90 В и силу тока 20–40 мА. Проводить электрофорез в течение 1–1,5 ч.

9. Отключить напряжение, достать гель (*в перчатках!*) и пере-нести на стекло трансиллюминатора. Закрыть защитной крышкой и включить ультрафиолет. Для начала убедиться в успешности элек-трофоретического разделения, просмотрев разделение маркера. Пронаблюдать светящиеся полосы: рядом с лунками – плазмид-ная ДНК, облака на противоположной стороне – продукты дегра-дации РНК.

10. Внести в рабочую тетрадь основные принципы проведения электрофоретического разделения ДНК в агарозном геле.

Вопросы для самоподготовки

1. Какие типы гелей используются в электрофорезе биополимеров? Какие они имеют свойства, достоинства и недостатки?
2. Как возможно визуализировать ДНК в геле, после электрофореза?
3. Для чего используют буфер для внесения и маркер молекулярных масс?
4. Почему для электрофореза и приготовления геля используют специальные буферы, а не дистиллированную воду? Почему буфер имеет щелочную pH, а не кислую?
5. Каким методом, кроме электрофореза, можно установить качество выделенной ДНК и ее концентрацию?

Лабораторная работа № 13 Рестрикция плазмидной ДНК

Основные теоретические положения

Среди ферментов, используемых в генной инженерии и молекулярной биологии, большое значение имеют эндонуклеазы рестрикции – *рестриктазы*. Эти ферменты, впервые открытые как часть системы рестрикции – модификации ДНК у бактерий, специфически гидролизуют молекулы двуцепочечных ДНК при наличии в них определенных последовательностей нуклеотидов. Названия рестриктаз складываются из первых букв видовых названий бактерий, в которых они обнаружены, например *Eco* – *E. coli*. Цифры, следующие за буквенными обозначениями, отражают последовательность открытия соответствующих рестриктаз в клетках бактерий одного вида, например *HaeI*, *HaeII* и *HaeIII* из *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*.

Все рестриктазы делят на три класса.

Рестриктазы I класса используют несимметричные сайты узнавания и расщепляют ДНК в произвольных местах в пределах от нескольких сотен до нескольких тысяч пар нуклеотидов от сайта узнавания. На практике данные классы рестриктаз практически не используются, так как получаемые фрагменты ДНК случайны.

У рестриктаз II класса совпадают сайты узнавания и расщепления, и эти ферменты чаще всего используются в молекулярной генетике. Эти рестриктазы узнают палиндромные последовательности. Результат работы подобных рестриктаз предсказуем и поддается анализу.

Рестриктазы III промежуточного типа узнают сайт рестрикции и разрезают ДНК, отступив от него на определенное количество пар нуклеотидов.

Большинство рестриктаз специфически узнают на ДНК тетра- и гексануклеотидные последовательности, называемые *сайтами рестрикции*. В большинстве случаев гидролиз молекулы ДНК происходит на сайтах рестрикции с образованием так называемых «липких концов» (рис. 19). Это очень важно, так как подобные «липкие концы» могут самостоятельно или с помощью ферментов лигаз сшиваться между собой. Используется это в молекулярной биологии для встраивания нужных генов в нужную плазмиду, если и участок ДНК с этим геном, и плазида были обработаны одной и той же рестриктазой.

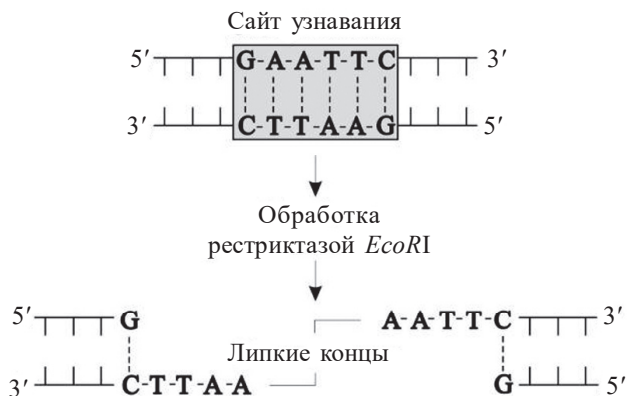


Рис. 19. Сайт рестрикции *EcoRI*

Чем короче олигонуклеотидная последовательность сайта рестрикции, узнаваемого рестриктазой, тем чаще он встречается в случайной последовательности нуклеотидов. Для большинства сайтов, узнаваемых рестриктазами, характерно наличие в них сим-

метрии, то есть узнаваемые ими последовательности представляют собой палиндромы, например у рестриктазы *EcoRI* – 5'-GAATTC-3'. Поскольку такие участки комплементарны сами себе и друг другу и могут между собой взаимодействовать, их и называют «липкими концами».

Как и любые другие ферменты, рестриктазы обладают определенной активностью, которая зависит от множества факторов. Она измеряется в единицах активности: одна единица активности рестриктазы полностью гидролизует 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при температуре инкубации 37 °С. Для своей работы рестриктазам необходимы ионы Mg^{2+} и рН в определенных пределах. Такие условия обеспечиваются буферными растворами на основе Tris–HCl, Tris-ацетата и т. д.

Цель работы: изучить эндонуклеазы рестрикции и их роль в молекулярной биологии и биотехнологии, освоить методику рестрикционного анализа.

Оборудование и реактивы

1. Плазмидная ДНК.
2. Рестриктазы.
3. Буфер ($\times 10$ буфер для рестриктазы *EcoRI*): 500мМ Tris–HCl, рН 7,5.
4. Термостат.
5. Микропробирки.
6. Автоматические пипетки с наконечниками.
7. Лед.
8. Буфер для внесения с красителем бромфеноловым синим.
9. Камера для горизонтального электрофореза с заливочным столиком.
10. Источник постоянного тока.
11. Электроплитка.
12. Трансиллюминатор.

Ход работы

1. В реакционную смесь добавить следующие компоненты:
– 3–7 мкл плазмидной ДНК (0,5–1 мкг);

- 2 мкл буфера для рестрикции (10-кратный);
- 1 мкл рестриктазы;
- H₂O до 20 мкл.

Рестриктазу (как и любой другой фермент) следует хранить при –20 °С в морозильнике. Доставать ее оттуда необходимо строго перед добавлением в реакционную среду и в последнюю очередь и держать всегда во льду. После добавления сразу же убрать обратно морозильник.

2. Реакцию рестрикции провести в объеме 20 мкл в течение 2–3 ч в термостате при температуре 37 °С.

3. По окончании проведения рестрикции к реакционной смеси добавить краситель и провести анализ разделением образовавшихся фрагментов в 1 % агарозном геле.

4. В рабочей тетради отметить теоретические основы рестрикционного анализа, методику его проведения и полученные результаты.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое палиндром? Что такое «липкие концы»?
2. На какие классы делятся рестриктазы? Чем они отличаются? Какое значение имеют в биотехнологии?
3. Как в биотехнологиях используют рестриктазы?

Лабораторная работа № 14

Получение компетентных клеток кишечной палочки химическим методом

Основные теоретические положения

Процесс поглощения экзогенной ДНК бактериальными клетками, сопровождающийся приобретением ими новых генетических маркеров, называют *генетической трансформацией*. Это один из трех возможных способов естественной передачи ДНК от одной бактериальной клетки к другой. Поглощение ДНК бактериофагов называется *трансфекцией* фаговой ДНК. Поглощение плазмидной ДНК называется *трансформацией*. Трансформации и транс-

фекции подвергаются только *компетентные клетки*. Компетентность – состояние бактериальных клеток, при котором они способны сорбировать экзогенную ДНК на своей поверхности и поглощать ее. Это происходит за счет наличия на поверхности бактериальной клетки особых факторов компетентности. Экзогенная ДНК может быть интегрирована в бактериальную хромосому или существовать в виде внехромосомного элемента.

Для многих грамположительных бактерий компетентность является естественным свойством, которое становится максимально выраженным на определенных этапах роста культуры. У важных для генной инженерии грамотрицательных клеток *E. coli* естественная компетентность отсутствует, и клетки приобретают ее лишь в искусственных условиях. Установлено, что при низких температурах и в присутствии двухвалентных катионов экзогенная ДНК может с высокой эффективностью проникать внутрь бактериальных клеток. Частоту трансформации клеток *E. coli* можно повысить разными способами. Наиболее популярными являются тепловой шок, введение в инкубационную смесь одновалентных катионов (Rb^+) или выращивание бактериальных клеток на среде с повышенным содержанием ионов Mg^{2+} (10–20 мМ).

Современные методики трансформации бактериальных клеток позволяют получать до 10^7 – 10^8 трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК.

Цель работы: освоить методику приготовления компетентных к генетической трансформации клеток.

Оборудование и реактивы

1. Жидкая среда LB для культивирования *E. coli*.
2. Антибиотик тетрациклин.
3. Буфер 1: 50 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Tris-HCl pH 8,0.
4. Буфер 2: 10 мМ KCl, 75 мМ $CaCl_2$, 15 % глицерин.
5. Чашка Петри с культурой *E. coli* (штамм *XLI-blue* или другие).
6. Стерильные конические колбы и пробирки.
- 7 Стерильные пипетки, микробиологические петли.
8. Шейкер-инкубатор.
9. Центрифуга с охлаждением.

Ход работы

1. Засеять на ночь культуру *E. coli* в пробирку с 5 мл среды LB, содержащей антибиотик тетрациклин в концентрации 15 мкг/мл.

2. Утром перенести 1 мл ночной культуры в колбу объемом 100 мл с 20 мл среды LB с тетрациклином. Наращивать в течение 2 ч при 37 °С на шейкере до оптической плотности, равной 0,3 (при $\lambda = 600$ нм).

3. Перенести в пластиковую пробирку (типа *Falcon*), уравновесить и отцентрифугировать при 2500 об./мин. 10 мин. в центрифуге с охлаждением.

4. Слить супернатант, перевернуть пробирку на фильтровальную бумагу и дать стечь остаткам среды.

5. Поместить пробирку с клетками в стакан со льдом. Аккуратно ресуспендировать клетки в 10 мл охлажденного буфера 1.

6. Центрифугировать 5–7 мин. при 2500 об/мин. на центрифуге с охлаждением.

7. Слить надосадочную жидкость. Поместить пробирку на ледяную баню и добавить 2 мл охлажденного буфера 2.

8. Расфасовать приготовленные компетентные клетки по охлажденным стерильным микропробиркам по 150 мкл. Использовать в тот же день или хранить в морозильной камере не более недели. Для длительного хранения компетентные клетки следует помещать в низкотемпературные морозильники (кельвинатор) при температуре -72 °С.

Вопросы для самоподготовки

1. Что такое химическая компетентность клеток? Какими способами, кроме химического, может быть достигнуто состояние компетентности?

2. Как повысить компетентность клеток?

3. На какой стадии роста клетки обладают наибольшей компетентностью?

4. Какие изменения происходят в надмембранных структурах и плазматической мембране клетки при придании ей компетентности?

Лабораторная работа № 15

Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Основные теоретические положения

Трансформация – один из трех возможных способов обмена ДНК между бактериями, в том числе различных видов. Как уже известно, трансформации могут подвергаться только компетентные клетки. Изначально плазида должна адсорбироваться на клетке. Адсорбция совершается на специальные поверхностные рецепторы, где ДНК связывается с белками и за счет них проникает в клетку. В этом процессе одна нить ДНК необратимо разрушается белками за счет нуклеазной активности, а вторая нить проникает в клетку. От внутриклеточных нуклеаз однонитевую ДНК защищают специальные белки, они же обеспечивают контакт ДНК и хромосомной ДНК и рекомбинации с ней. Так происходит при трансформации хромосомной ДНК.

При трансформации ДНК плазмидной разница лишь в том, что плазида не интегрируется в основной геном бактериальной клетки.

Цель работы: придать бактериальным клеткам новое свойство – устойчивость к антибиотику посредством трансформирования компетентных клеток плазмидой с геном устойчивости к антибиотику.

Оборудование и реактивы

1. Стерильные чашки Петри, микробиологические пипетки, шпатель Дригальского.
2. Среда LB.
3. Антибиотики тетрациклин и ампициллин.
4. Аликвота компетентных клеток *E. coli*.
5. Плазмидная ДНК.

Ход работы

1. Подготовить стерильные чашки с агаризованной средой, содержащей антибиотика ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл) и тетрациклин (конечная концентрация 12,5 мкг/мл).

2. Разморозить на льду компетентные клетки *E. coli*.
3. 1 мкл плазмидной ДНК развести в 20 мкл дистиллированной воды и смешать с компетентными клетками.
4. Выдержать смесь на льду в течение 30 мин.
5. Поместить клетки с ДНК в термостат на 42 °С на 2 мин. (тепловой шок).
6. Добавить 1 мл среды LB и выдержать клетки 60 мин. в термостате на 37 °С. Через каждые 15 мин. перемешивать клетки.
7. Центрифугировать суспензию клеток 30 сек. при 5000 об/мин.
8. Слить половину надосадочной жидкости, а вторую половину использовать для ресуспендирования бактерий.
9. Отобрать микропипеткой 100 мкл клеток, смешанных с плазмидной ДНК, и втирать в чашки Петри с агаром (круговыми движениями до полного впитывания жидкости).
10. Инкубировать в течение суток в термостате при 37 °С.
11. На следующий день провести подсчет числа выросших колоний. Убедиться, что бактерии приобрели устойчивость к ампициллину. Ген данного признака закодирован на плазмидной ДНК.

Вопросы для самоподготовки

1. Что представляет собой плазида? Какие части в ней выделяют?
2. Назовите основные этапы трансформации клеток, дайте им биологическое объяснение.
3. Для чего в промышленности применяют генетическую трансформацию бактерий? Приведите примеры биотехнологических производств.
4. Где могут быть локализованы гены резистентности к антибиотикам? Где в приведенном примере находились гены резистентности к тетрациклину и к ампициллину? Какое значение это имеет в биотехнологии и медицине?

ПЛАН РАБОТЫ В СЕМЕСТРЕ

Т а б л и ц а 6

№ п/п	Лекции	Практические занятия	Контрольные мероприятия
1	Введение	Вводное занятие. Основы работы в микробиологических лабораториях и техника безопасности	–
2	Морфология бактерий	Лабораторная работа № 1	–
3		Лабораторная работа № 2	–
4	Метаболизм бактерий	Лабораторная работа № 3	–
5		Лабораторная работа № 4	Контрольная работа № 1. Морфология бактерий
6		Лабораторная работа № 5	–
7	Генетика бактерий	Лабораторная работа № 6	–
8		Лабораторная работа № 7	Контрольная работа № 2. Метаболизм бактерий
9	Разнообразие прокариот	Лабораторная работа № 8	Домашняя работа № 1. Сравнительный анализ различных типов брожений
10		Лабораторная работа № 9	Контрольная работа № 3. Генетика бактерий

О к о н ч а н и е т а б л . 6

№ п/п	Лекции	Практические занятия	Контрольные мероприятия
11		Лабораторная работа № 10	
12		Лабораторная работа № 11	
13		Лабораторная работа № 12	
14	Значение бактерий	Лабораторная работа № 13	Контрольная работа № 4. Разнообразие бактерий
15		Лабораторная работа № 14	
16	Медицинская и санитарная микробиология	Лабораторная работа № 15	Домашняя работа № 2. Описание возбудителя инфекционного заболевания и вызываемой инфекции
17		Зачетное занятие по приготовлению препаратов	

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ

Морфология прокариот

1. Какие группы морфотипов существуют среди бактерий?
2. Какие морфотипы кокков вы знаете? Приведите примеры.
3. В чем разница между строением клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий?
4. Какие морфотипы палочек вам известны? Приведите примеры.
5. Назовите обязательные части клетки бактерии. В чем заключаются их функции?
6. Назовите морфотипы извитых бактерий. Приведите примеры.
7. Что относят к внешним частям бактериальных клеток и в чем заключается их функция?
8. Опишите покоящиеся формы у различных таксономических групп бактерий. В чем особенности каждой из этих форм?
9. Как осуществляются синтез и работа жгутиков бактерий и архей?
10. В чем особенности клеточной стенки кислотоустойчивых бактерий?

История и методы микробиологии

11. Какой вклад в микробиологию внесли Р. Кох и Л. Пастер?
12. Какое значение для микробиологии имеют открытия Виноградского и М. Бейеринка?
13. В чем особенности и преимущества темнопольной микроскопии?
14. Каковы принцип работы и преимущества фазово-контрастной микроскопии?
15. Укажите особенности конструкции микроскопа для люминесцентной микроскопии. В чем преимущества такого метода?
16. Что такое ламинарный бокс и каков принцип его работы?
17. Назовите основные способы температурной стерилизации.

18. Назовите основные способы холодной стерилизации.
19. Распишите подробно процесс приготовления фиксированного окрашенного препарата.
20. Опишите процесс окраски по Граму и его теоретическое обоснование.

Метаболизм прокариот

21. В чем основные различия оксигенного и аноксигенного фотосинтеза?
22. В чем особенности КДФГ-пути как процесса разложения глюкозы до ПВК? Каковы основные стадии этого процесса и энергетический выход?
23. Что такое метилотрофия? Нарисуйте общую схему использования C1-соединений метилотрофами.
24. В чем основной энергетический смысл брожений? Как брожения используется на практике?
25. Опишите способы синтеза АТФ в клетках бактерий. В каких процессах они происходят?
26. Что такое субстратное фосфорилирование, каков его механизм и в каких энергетических процессах бактерий оно осуществляется?
27. В чем особенности синтеза АТФ, сопряженного с транспортом электронов у бактерий?
28. В чем особенности бесхлорофилльного фотосинтеза? Какие микроорганизмы его осуществляют?
29. С помощью каких циклов, помимо рибулозобисфосфатного, бактерии способны фиксировать CO_2 ? В чем особенности этих циклов?
30. Что такое азотфиксация? Какими бактериями и в каких условиях этот процесс осуществляется? Какое значение он имеет для биосферы?

Генетика прокариот

31. Что такое оперон и как он организован в геноме бактерии?
32. В чем особенности конъюгации как одной из форм обмена ДНК между клетками бактерий?

33. В каких формах ДНК может храниться в клетках бактерий?
34. Что такое цистрон? У каких организмов полицистронные РНК, а у каких – моноцистронные?
35. В чем отличия реализации генетической информации бактерий по сравнению с эукариотическими организмами?
36. Что происходит во время пептидилтрансферазной реакции? Где эта реакция происходит?
37. Что такое трансформация? Каким свойством должна обладать клетка, чтобы иметь возможность трансформации?
38. Опишите работу лактозного оперона в присутствии глюкозы и лактозы.
39. Как плаزمид используется в молекулярной инженерии?
40. Что такое промотор, и какие виды промоторов существуют?

Разнообразие бактерий и архей

41. На чем основывается фенотипическая классификация бактерий Берджи? На какие основные группы в ней подразделяются прокариоты?
42. На чем основывается филогенетическая классификация микроорганизмов? В чем ее преимущества и недостатки?
43. Что такое парадоксальность таксонов в филогенетической систематике?
44. Дайте сравнительную характеристику архей, бактерий и эукариот. Опишите краткую систематику архей.
45. На какие таксоны и на основании чего подразделяются цианобактерии? В чем особенности их таксономии в целом?
46. Опишите морфологические образования, специфические для цианобактерий.
47. Опишите значение цианобактерий в биосфере в геологическом прошлом и в настоящее время.
48. Дайте общую характеристику представителей типов *Chloroflexi* и *Chlorobi*.
49. Назовите основные признаки протеобактерий. Дайте их общую характеристику, а также опишите представителей класса *Betaproteobacteria*.

50. Назовите основные признаки фирмикут. Дайте их общую характеристику, а также опишите представителей класса *Clostridia*.

51. Назовите основные признаки актинобактерий. Дайте их общую характеристику. Опишите представителей класса *Actinobacteria*, порядка *Corynebacteriales*, *Micrococcales*, *Streptomyetales*.

52. Укажите особенности домена археи. Дайте общую характеристику галоархей.

53. Дайте общую характеристику представителей типов *Chlamydiae* и *Spirochaetes*.

54. Назовите основные признаки протеобактерий. Дайте их общую характеристику. Опишите представителей класса *Gamma-proteobacteria*.

55. Дайте общую характеристику таксонов, относящихся к «зеленым» фотосинтетикам.

56. Укажите основные признаки протеобактерий. Назовите основных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, проанализируйте их значение.

57. Назовите основные признаки протеобактерий. Охарактеризуйте представителей классов *Deltaproteobacteria* и *Epsilonproteobacteria*, укажите их особенности.

58. Опишите бактерии-термофилы: охарактеризуйте их систематику, особенности строения и значение для человека.

59. В чем отличие серных фотосинтетиков от несерных?

60. Микроорганизмы каких таксонов входят в состав микрофлоры различных органов организма человека?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Мелкие репродуктивные клетки цианобактерий, образующиеся в большом количестве в результате неравномерного деления:

- А. Акинеты.
- Б. Гормогонии.
- В. Беоциты.
- Г. Гонидии.

2. Запасное вещество полифосфатной природы у некоторых бактерий:

- А. Гранулеза.
- Б. Гликоген.
- В. Крахмал.
- Г. Волютин.

3. Микроорганизмы, способные развиваться на средах без добавления факторов роста:

- А. Ауксотрофы.
- Б. Полноценные.
- В. Прототрофы.
- Г. Азотфиксаторы.

4. Бактерии с монополярным расположением пучка жгутиков:

- А. Лофотрихи.
- Б. Монотрихи.
- В. Амфитрихи.
- Г. Перитрихи.

5. Одни из возможных структурных компонентов клеточной стенки архей:

- А. Тейхоевые кислоты.
- Б. Муреин.
- В. Псевдомуреин.
- Г. Миколовые кислоты.

6. Специальные органеллы, содержащие РубисКо и карбоангидразу:

- А. Карбоксисомы.
- Б. Рибосомы.
- В. Пероксисомы.
- Г. Стромасомы.

7. Соотнесите название процесса с самим процессом:

- А. Органика \rightarrow H_2S .
- Б. $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow$ органика.
- В. $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$.
- Г. $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} \rightarrow$ органика.
- Д. $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$.

- 1 – ассимиляционная сульфатредукция,
- 2 – окисление сульфидов,
- 3 – диссимиляционная сульфатредукция,
- 4 – минерализация,
- 5 – ассимиляция сульфатов.

8. Микроорганизмы, развивающиеся при давлениях от 700 атмосфер:

- А. Пьезофилы.
- Б. Алкалофаги.
- В. Алкалофилы.
- Г. Альгофаги.

9. Гетерополимер N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой

кислоты:

- А. Тейхоевые кислоты.
- Б. Муреин.
- В. Псевдомуреин.
- Г. Миколовые кислоты.

10. Микроорганизмы, температурный оптимум роста которых находится в пределах 20–45 °С:

- А. Термофилы.
- Б. Нейтрофилы.
- В. Мезофилы.
- Г. Медиафилы.

11. Укажите, для чего не используются пили различных типов:

- А. Движение.
- Б. Прикрепление.
- В. Размножение.
- Г. Брожение.

12. К извитым бактериям не относятся:

- А. Сарцины.
- Б. Спирохеты.

- В. Вибрионы.
 - Г. Спириллы.
13. Микроорганизмы, оптимум рН которых > 7 :
- А. Психрофилы.
 - Б. Нейтрофилы.
 - В. Алкалофилы.
 - Г. Базофилы.
14. Организмы, использующие неорганический углерод как основной источник углерода:
- А. Литотрофы.
 - Б. Хемотрофы.
 - В. Автотрофы.
 - Г. Гетеротрофы.
15. КДФГ в пути Энтнера – Дудорова распадается на:
- А. ПВК и ФГК.
 - Б. ПВК и ФГА.
 - В. Две молекулы ФГА.
 - Г. CO_2 и ПВК.
16. В чем преимущества пентозофосфатного пути окисления глюкозы бактерий?
- А. Больше выход энергии.
 - Б. Больше утилизируется NAD^+ .
 - В. Разложение протекает быстрее.
 - Г. Задействовано меньше ферментов.
17. При каком типе «размножения» бактерий происходит непосредственный контакт двух клеток:
- А. Трансформация.
 - Б. Конъюгация.
 - В. Транслокация.
 - Г. Трансдукция.
18. Основную массу клеточной стенки грамположительных бактерий составляют:
- А. Липополисахариды.
 - Б. Муреин.
 - В. Псевдомуреин.
 - Г. Тейхоевые кислоты.

19. Отметьте характерное для капсул свойство:

- А. Защищает от антибиотиков.
- Б. Состоит из липидов.
- В. Гидрофильность.
- Г. Хорошо воспринимает красители.

20. Кислотоустойчивость характерна для:

- А. Риккетсий.
- Б. Хламидий.
- В. Дифтерийной палочки.
- Г. Микобактерий.

ПРИМЕРНЫЕ ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ

1. Предмет, задачи, разделы микробиологии, ее связь с другими науками.
2. Основные этапы развития микробиологии. Отцы-основатели различных сфер микробиологии.
3. Классификация микроорганизмов. Различия между эукариотами, прокариотами и археями.
4. Общий план строения бактериальной клетки.
5. Клеточная стенка различных систематических групп прокариот: общая схема и особенности строения, назначение.
6. Поверхностные структуры бактерий, их свойства и функции.
7. Варианты морфотипов бактерий с примерами.
8. Различные покоящиеся формы бактерий и организмы, их образующие. Их свойства и функции.
9. Метаболизм бактерий. Взаимосвязь катаболизма и анаболизма. Амфиболизм.
10. Классификация типов метаболизма микроорганизмов.
11. Способы синтеза АТФ в клетках бактерий.
12. Пути окисления глюкозы у бактерий: реакции, особенности, энергетический выход, значение.
13. ЦТК и аэробное дыхание у бактерий: особенности, примеры микроорганизмов.
14. Анаэробное дыхание бактерий: различные виды, их особенности, значение для бактерий и для биосферы, примеры микроорганизмов.
15. Брожения: виды, общий смысл, условия протекания, примеры микроорганизмов.
16. Молочнокислое брожение и молочнокислые бактерии: биохимия и значение процесса, его практическое применение.
17. Спиртовое брожение и бактерии, его осуществляющие. Биохимия и значение процесса, его практическое применение.
18. Группы бактерий-фотосинтетиков. Особенности бактериального фотосинтеза.
19. Пурпурные серные и несерные бактерии: общие сведения, особенности их фотосинтеза.
20. Зеленые фотобактерии и гелиобактерии: общие сведения, особенности их фотосинтеза.

21. Фотосинтез цианобактерий: общие сведения, особенности.
22. Аэробное дыхание с использованием C1-соединений (метилотрофия): общие сведения, использование C1-соединений в катаболизме и анаболизме, микроорганизмы-метилотрофы.
23. Хемолитоавтотрофия: разновидности, особенности, представители.
24. Ассимиляция углерода: какие организмы, в какой форме и как ассимилируют углерод.
25. Ассимиляция азота: какие организмы, в какой форме и в каких процессах ассимилируют неорганический азот.
26. Азотфиксация: общая схема, биохимия процесса, особенности процесса, организмы, его осуществляющие. Значение для микроорганизма, биосферы и сельского хозяйства.
27. Ассимиляция нитратов микроорганизмами: общая схема, биохимия и особенности процесса, организмы, его осуществляющие. Значение для микроорганизма, биосферы и сельского хозяйства.
28. Неполное окисление – механизм, биология уксуснокислых бактерий. Понятие биотрансформации.
29. Доноры и акцепторы электронов в энергетическом метаболизме микроорганизмов.
30. Организация генетического материала бактериальной клетки.
31. Плазмиды у бактерий: виды, их значение и структура. Использование плазмид в биотехнологии: общая схема эксперимента.
32. Теоретические основы методов выделения хромосомной и плазмидной ДНК у бактерий.
33. Особенности реализации генетической информации у бактерий.
34. Способы размножения бактерий. Трансформация и ее стадии. Конъюгация: механизмы и этапы. F- и Hfr-факторы. Трансдукция, ее типы.
35. Горизонтальный перенос генов и его значение в различных сферах микробиологии, медицины и биотехнологии.
36. Взаимоотношения бактерий и архей с вирусами. Система адаптивного иммунитета бактерий и архей *Crispr-Cas* и ее использование в генетической инженерии и персонализированной медицине.
37. Принципы классификации бактерий. Признаки, используемые для их идентификации. Фенотипическая классификация Берджи и ее сложности. Филогенетическая систематика, парадоксальность таксонов. Сложности в филогенетической систематике бактерий.
38. Альфа- и бета-протеобактерии: общее описание, классы протеобактерий, основные подтаксоны и представители. Значение протеобактерий для биосферы и человека.

39. Гамма-, дельта- и эpsilon-протеобактерии: общее описание, классы протеобактерий, основные подтаксоны и представители. Значение протеобактерий для биосферы и человека.

40. Цианобактерии: общие свойства и характерные признаки, значение для биосферы в прошлом и в настоящее время. Характерные структуры цианобактерий и их деление на секции.

41. Фотосинтетический аппарат цианобактерий, особенности фотосинтеза.

42. Общая характеристика фирмикут, их характерные признаки, основные классы и представители.

43. Общая характеристика актинобактерий, их характерные признаки, основные порядки и представители.

44. Термофилы и экстремальные термофилы типов *Aquificae*, *Thermotogae*, *Deinococcus-Thermus*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermomicrobia* – общее описание типов и представителей, морфология, метаболизм, места обитания.

45. Бактерии типов *Chrysiogenetes*, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*, *Deferribacteres* – общее описание типов и представителей, морфология, метаболизм, места обитания.

46. Бактерии типа *Chlorobi* и *Planctomycetes* – общее описание, морфология, метаболизм, места обитания. Понятие «квазиэукариотизм», его формирование и значение для клеток.

47. Бактерии типа *Chlamydiae* – морфология, метаболизм, места обитания. Особенности клеточного цикла, вызываемые инфекции. Бактерии типов *Spirochaetes*, *Fusobacteria* – морфология, метаболизм, места обитания, вызываемые инфекции.

48. Бактерии типов *Fibrobacteres*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Dictyoglomi* – общее описание, морфология, метаболизм, места обитания.

49. Общая характеристика домена архей. Отличительные признаки, сходства и различия с бактериями и эукариотами.

50. Морфологические особенности архей – строение мембраны, клеточной стенки, внутреннего содержимого, жгутиков по сравнению с бактериями и эукариотами.

51. Метаболические и генетические особенности архей по сравнению с бактериями и эукариотами.

52. Археи-метаногены – общая характеристика, биохимия метаногенеза, его значение для биосферы. Галоархеи – общая характеристика, особенности метаболизма и фотосинтеза. Способы приспособления к экстремальным концентрациям соли.

53. Тип *Crenarchaeota* – общая характеристика, особенности морфологии и метаболизма. Места обитаний и приспособление к обитанию в них. Тип *Nanoarchaeota* – общая характеристика, особенности морфологии и метаболизма.

54. Участие микроорганизмов в круговороте углерода и кислорода.

55. Участие микроорганизмов в круговороте азота.

56. Участие микроорганизмов в круговороте серы.

57. Пример анаэробного круговорота веществ, его существование в настоящем и геологическом прошлом.

58. Экологические группы микроорганизмов.

59. Взаимоотношения между микроорганизмами в природе, их значение в формировании микробиоценозов.

60. Микрофлора воды, воздуха, почвы. Микрофлора человека и ее значение.

61. Различные методы микроскопии, принципы их работы, преимущества и недостатки.

62. Методы окраски микроорганизмов, их теоретическое обоснование.

63. Накопительные и чистые культуры микроорганизмов, методы получения и значение.

64. Принципы составления питательных сред для микроорганизмов. Типы сред, используемые в микробиологической практике. Теория и методы стерилизации.

65. Стационарное культивирование клеток, кривая роста клеток на неменяемых средах. Особенности отдельных фаз. Синхронные культуры, назначение. Способ получения. Непрерывное культивирование микроорганизмов – его приемы и применение.

66. Необходимость количественного учета микроорганизмов (единицы измерения, прямые и косвенные методы).

67. Действие молекулярного кислорода на рост микроорганизмов различных групп. Приемы культивирования аэробов и анаэробов.

68. Медицинская микробиология, ее основные проблемы. Патогенные бактерии. Теория инфекционной болезни.

69. Значение бактерий в жизни человека, их использование человеком. Методы сохранения продуктов питания и природных материалов от действия микроорганизмов.

РЕЦЕПТЫ РЕАКТИВОВ

Бумага, пропитанная раствором уксуснокислого свинца

Нарезать полоски фильтровальной бумаги, погрузить их в 5 % водный раствор уксуснокислого свинца ($PbCH_3COO$)₂, высушить на воздухе. Стерилизовать в чашке Петри автоклавированием при 0,5 ати. При наличии сероводорода цвет бумаги будет изменяться с белого на черно-бурый.

Генциановый фиолетовый феноловый

Добиться полного растворения 1 г генцианового фиолетового в 10 мл 96° этанола, затем смешать полученный раствор со 100 мл 5 % водного свежеперегнанного фенола.

Красители для выявления липидов

Растворить 0,5 г судана III в 100 мл концентрированной молочной кислоты.

Растворить 0,3 г судана черного В в 100 мл 70 % горячего этанола – 100 мл.

Растворы выдерживать несколько часов при 60°С в закрытой емкости, после чего охладить и отфильтровать.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)

2 г метиленового синего растворить в 100 мл 96° этанола. В следующие 48 ч раствор следует регулярно взбалтывать, затем отфильтровать. Краситель может храниться длительное время.

Метиленовый синий (водный раствор)

Смешать 1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 40 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий (витальный краситель)

Смешать 50 мкл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 50 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий по Леффлеру

Смешать 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего, 100 мл дистиллированной вода и 1 мл 1 % водного раствора КОН.

Раствор Люголя в модификации Грама

В ступку поместить 1 г кристаллического йода и 2 г йодистого калия, растереть смесь пестиком. Добавить 1 мл дистиллированной воды, продол-

жая растирать. Не переставая растирать, добавить еще 4 мл воды. Йод будет растворяться только в растворе йодистого калия. После полного растворения компонентов смесь вылить в емкость, объем довести до 300 мл. Хранить следует только в темной посуде и не более 30 суток.

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы

Йод кристаллический – 1,0 г; калий йодистый – 3,0 г; вода дистиллированная – 300 мл. Процесс приготовления аналогичен раствору Люголя в модификации Грама.

Сафранин (водный раствор)

0,25 г сафранина растворить в 10 мл 96° этанола, добавить 100 мл дистиллированной воды.

Тушь для негативного контрастирования

Смешать 10 мл черной туши и 30 мл дистиллированной воды. Разведенную в воде тушь центрифугировать, надосадочный слой разлить по пробиркам и стерилизовать при 0,5 ати.

Фуксин основной (насыщенный спиртовой раствор)

Взвесить 10 г фуксина основного и растворить в 100 мл 96° этанола.

Фуксин основной феноловый (фуксин Циля)

10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина смешать со 100 мл 5 % раствора свежеперегнанного фенола. Через 48 ч отфильтровать приготовленный краситель. Он может храниться длительное время.

Фуксин основной (водный раствор)

Смешать 1 мл фенолового фуксина Циля и 9 мл дистиллированной воды. Краситель долго не хранится, поэтому следует готовить его непосредственно перед использованием.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

О с н о в н а я

Нетрусов А. И. Микробиология : учебник [для вузов] / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. М. : Академия, 2006. 352 с.

Шлегель Г. Общая микробиология = Allgemeine Mikrobiologie / Г. Шлегель ; пер. с нем. Л. В. Алексеевой ; под ред. Е. Н. Кондратьевой. М. : Мир, 1987. 566 с.

Гусев М. В. Микробиология : учебник для вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. 6-е изд., стер. М. : Academia, 2006. 464 с.

Фирсов Н. Н. Краткий словарь микробиологических терминов : учеб. пособие / Н. Н. Фирсов. 2-е изд., испр. и доп. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2002. 192 с.

Д о п о л н и т е л ь н а я

Брюханов А. Л. Молекулярная микробиология = Molecular microbiology : учебник для вузов / А. Л. Брюханов, К. В. Рыбак, А. И. Нетрусов ; под ред. А. И. Нетрусова. М. : Изд-во Моск. ун-та, 2012. 476 с.

Воробьев А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие для вузов / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широбоков. 2-е изд., стер. М. : Академия, 2006. 461 с.

Воробьева Л. И. Археи : учеб. пособие для вузов / Л. И. Воробьева. М. : Академкнига, 2007. 447 с.

Воробьева Л. И. Промышленная микробиология : [учеб. пособие для биол. и технол. специальностей вузов] / Л. И. Воробьева. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1989. 293, [1] с.

Заварзин Г. А. Введение в природоведческую микробиологию : учеб. пособие для вузов / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. М. : Университет, 2001. 256 с.

Заварзин Г. А. Три жизни великого микробиолога : Документальная повесть о Сергее Николаевиче Виноградском / Г. А. Заварзин ; под ред. и с коммент. Н. Н. Колотиловой ; Рос. акад. наук, Ин-т микробиологии им. С. Н. Виноградского. М. : [ЛИБРОКОМ], 2009. 238 с.

Крюи П. де. Охотники за микробами / Поль де Крюи ; [пер. с англ. О. П. Червонского]. СПб. : Амфора, 2006. 358, [1] с.

Панчин А. Сумма биотехнологии : руководство по борьбе с мифами о генетической модификации растений, животных и людей / А. Панчин. М. : АСТ, [2016]. 429, [1] с.

Пиневич А. В. Микробиология. Биология прокариотов : учебник : [в 3 т.] / А. В. Пиневич ; Санкт-Петербург. гос. ун-т. СПб. : Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2007–2009. 2009. Т. 1. 455 с. Т. 2. 608 с. Т. 3. 329 с.

Печуркин Н. С. Популяционная микробиология / Н. С. Печуркин ; Акад. наук СССР, Сиб. отд., Ин-т физики им. Л. В. Киренского ; отв. ред. И. И. Гительзон. Новосибирск : Наука, Сиб. отд., 1978. 273 с.

Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студентов вузов / [А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.] ; под ред. А. И. Нетрусова. М. : Academia, 2005. 608 с.

Ручай Н. С. Биохимия и микробиология : учеб. пособие / Н. С. Ручай, С. В. Конев. М. : Экология, 1992. 240 с.

Современная микробиология. Прокариоты : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М. : Мир, 2005. (Лучший зарубежный учебник) / пер. с англ. Р. Н. Ивановского, Д. И. Никитина, В. К. Плакунова ; под ред. А. И. Нетрусова, Т. С. Ильиной. 2005. [Т. 1]. 656 с.

Современная микробиология. Прокариоты : в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М. : Мир, 2005. (Лучший зарубежный учебник) / пер. с англ. А. В. Лебединского, К. Л. Тарасова ; под ред. А. И. Нетрусова. 2005. [Т. 2]. 496 с.

Стейниер Р. Мир микробов = The microbial world : [в 3 т.] / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм ; пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, С. В. Шестакова. М. : Мир, 1979. Т. 1. 320 с. Т. 2. 334 с. Т. 3. 448 с.

Ткаченко К. В. Микробиология : конспект лекций / К. В. Ткаченко. М. : ЭКСМО, 2006. 158 с.

Шлегель Г. Г. История микробиологии / Г. Г. Шлегель ; пер. с нем. Т. Г. Мирчинк. М. : Едиториал УРСС, 2002. 304 с.

Учебное издание

Лавренчук Леонид Сергеевич
Ермошин Александр Анатольевич

МИКРОБИОЛОГИЯ

Практикум

Заведующий редакцией *М. А. Овечкина*
Редактор *Е. В. Березина*
Корректор *Е. В. Березина*
Компьютерная верстка *Г. Б. Головина*

Подписано в печать 05.07.19. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Цифровая печать.
Уч.-изд. л. 5,1. Усл. печ. л. 6,28. Тираж 40 экз. Заказ 151.

Издательство Уральского университета.
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio.marina.ovechkina@mail.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4.
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

Для заметок

