

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

**И.А. МИСЕТОВ Г.П. АЛЁХИНА**

# **МИКРОБИОЛОГИЯ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

Рекомендовано к изданию Редакционно - издательским  
советом государственного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2008

УДК 579(076.5)  
ББК 28.4я7  
М 65

Рецензент  
доктор медицинских наук, профессор Д.Г. Дерябин

М 65            **Мисетов И.А.**  
                  **Микробиология: методические указания к лабораторным**  
                  **занятиям/ И.А. Мисетов, Г.П. Алехина - Оренбург: ГОУ**  
                  **ОГУ, 2008. - 80 с.**

Методическое указание состоит из 7 разделов, которые включают наглядный материал, описание методик проведения работы и контрольные вопросы для самоподготовки.

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология» для студентов специальности 020209 «Микробиология» очной формы обучения.

ББК28.4я7

©Мисетов И.А., Алехина Г.П., 2008  
© ГОУ ОГУ, 2008

## Содержание

Введение.....	5
1 Морфология микроорганизмов.....	6
1.1 Методы изучения морфологии микроорганизмов.....	6
1.2 Простые способы окраски микроорганизмов.....	12
1.3 Сложные способы окраски микроорганизмов.....	15
2 Итоговое занятие по разделам «История развития микробиологии» и «Морфология микроорганизмов».....	18
3 Физиология роста микроорганизмов.....	18
3.1 Питание микроорганизмов.....	18
3.2 Физиология роста.....	25
4 Итоговое занятие по темам «Систематика» и «Физиологии роста микроорганизмов».....	31
5 Физиология микроорганизмов.....	31
5.1 Ферментативная активность микроорганизмов.....	31
5.2 Энергетический метаболизм. Брожение.....	33
5.3 Энергетический метаболизм. Дыхание.....	36
5.4 Конструктивный метаболизм.....	37
5.5 Разложение природных веществ.....	41
5.6 Итоговое занятие по темам: «Энергетический метаболизм», «Конструктивный метаболизм», «Разложение природных веществ».....	43
5.7 Фиксация молекулярного азота.....	43
5.8 Аэробные кислородные фототрофные бактерии (цианобактерии).....	45
5.9 Фототрофные бактерии и фотосинтез.....	50
6 Наследственность и изменчивость микроорганизмов.....	54
6.1 Спонтанный и индуцированный мутагенез.....	54
7 Микроорганизмы и окружающая среда.....	59
7.1 Методы оценки загрязнения природных водоемов.....	59
7.2 Санитарно-микробиологическое исследование воды.....	67
7.3 Санитарно-микробиологический контроль воздуха специализированных и жилых помещений.....	72
7.4 Санитарно-микробиологическое исследование почвы.....	74
Список использованных источников.....	77
Приложение А.....	78
Вопросы к зачету по курсу микробиологии.....	78
Приложение Б.....	80
Экзаменационные вопросы по курсу микробиологии.....	80

## **Введение.**

Микробиология в настоящее время по праву считается одной из основных дисциплин биологии, поскольку без знания особенностей микроорганизмов нельзя понять всего многообразия жизни на Земле, условий ее появления и эволюции. Огромное значение имело исследование микроорганизмов для таких наук, как биохимия, молекулярная биология, генетика, биофизика, экология.

Большое значение в народном хозяйстве приобретает использование микроорганизмов как продуцентов множества полезных веществ, как-то: кормового белка, ферментов, антибиотиков, витаминов. Активно разрабатываются способы рационального использования биохимической активности микроорганизмов для повышения плодородия почв, добычи полезных ископаемых, восполнения энергетических ресурсов и очистки окружающей среды от многих загрязняющих веществ.

Вместе с тем остается необходимость изыскивать эффективные способы борьбы с некоторыми микроорганизмами, вызывающими заболевания человека, животных и растений, а также порчу промышленных изделий и нежелательные изменения окружающей среды.

Настоящие методические указания являются одним из элементов оптимизации учебного процесса в курсе «Микробиология» и составлены с учетом основных тем в соответствии с действующей программой.

Приведенный в методическом указании материал, концентрирует основные понятия и практические навыки в области микробиологии, что способствует лучшему усвоению и запоминанию материала, а также поможет студентам как в подготовке к лабораторным занятиям, так и при подготовке к экзаменам.

Материал рассчитан на студентов изучающих микробиологию в институтах, университетах и может быть использован для самостоятельной работы.

# 1 Морфология микроорганизмов

## 1.1 Методы изучения морфологии микроорганизмов

### Основные вопросы темы:

- 1) предмет, задачи микробиологии;
- 2) исторические этапы формирования микробиологии как общебиологической дисциплины;
- 3) вклад отечественных ученых в развитие микробиологии как науки;
- 4) основные разделы микробиологии и их задачи.

### Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории

- 1 Не входить в лабораторию в пальто, головном уборе, не вносить посторонние вещи.
- 2 Приступать к занятиям только надев хлопчатобумажный халат.
- 3 Строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями.
- 4 С большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками.
- 5 Поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления - не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов.
- 6 Перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, убедиться в том, что пипетка закрыта с тупого конца ватой.
- 7 В лаборатории поддерживать чистоту и порядок. По окончании занятий протирать иммерсионный объектив микроскопа мягкой тканью, накрывать микроскоп полиэтиленовым чехлом, приводить в порядок рабочее место, мыть руки.
- 8 Помнить о том, что студенты несут ответственность за используемые ими микроскопы, другое лабораторное оборудование, чистоту рабочего места.
- 9 Перед уходом из лаборатории дежурному проверять чистоту помещения, а также выключены ли вода, электроприборы.

### Лабораторная работа № 1 Изучение устройства микроскопа

Цель работы - изучить устройство светового микроскопа.

Световой микроскоп (рисунок 1) состоит из двух частей - механической и оптической, каждая из которых состоит еще из нескольких элементов.

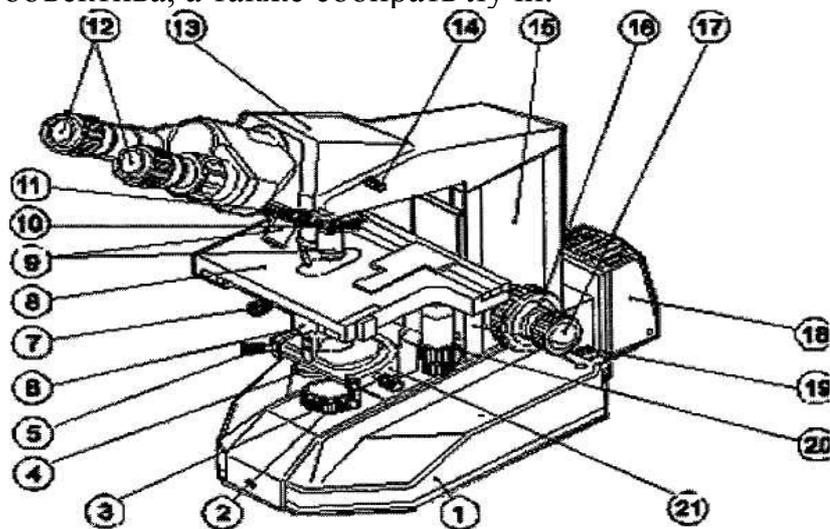
Механическая часть представлена штативом, который служит опорой для остальных компонентов микроскопа, предметным столиком и тубусом. К штативу примыкает коробка механизмов и система зубчатых колес. Система приводится в движение вращением двух винтов - макрометрического - для предварительной установки изображения, и микрометрического - для четкой установки. Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. В столик

вмонтированы зажимы, предназначенные для закрепления предметного стекла. В тубус заключены оптические элементы микроскопа. К нижней его части прикрепляется револьвер с гнездами для объективов.

Оптическая часть состоит из основного (объектив и окуляр) и вспомогательного (конденсор и зеркало) узлов.

Зеркало имеет две поверхности плоскую - используют при работе с конденсором, и вогнутую - применяют при работе без конденсора на малом увеличении. Конденсор собирает лучи, идущие от линзы и направляет их на объект.

Объектив - это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит изображение объекта. Окуляр служит для увеличения изображения, идущего от объектива, а также собирать лучи.



1 - основание; 2 - кольцо полевой диафрагмы; 3 - винт крепления конденсора; 4 - откидная оправа; 5 - винты, центрирующие конденсор; 6- конденсорное устройство; 7 - винт крепления предметного столика; 8 - предметный столик; 9 - объективы; 10 - револьверное устройство; 11-рифленое кольцо револьверного устройства; 12- окуляры; 13 - бинокулярная насадка; 14 -винт крепления бинокулярной насадки; 15 - штатив; 16 - рукоятка грубой фокусировки; 17 -рукоятка тонкой фокусировки; 18 - фонарь; 19 - кронштейн столика; 20 - рукоятка перемещения конденсора; 21 -кронштейн конденсорного устройства.

Рисунок 1 – Устройство микроскопа

Одна из важных характеристик микроскопа - разрешающая способность. Она определяет наименьшее расстояние между двумя точками на препарате, при котором изображение будет раздельным.

$$d = \frac{\lambda}{2A},$$

где  $\lambda$  - длина волны света (при дневном освещении 0,55 мкм);

A - числовая апертура объектива.

Величина увеличения объективов обозначена на их оправе. Каждый объектив характеризуется определенной величиной рабочего расстояния в миллиметрах. У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется исследование препарата начинать с по-

мощью объектива с небольшим увеличением. Рабочее увеличение окуляров колеблется от 4х до 15х. Функция окуляра - прямое мнимое увеличение действительного обратного увеличенного изображения, которое дает объектив.

Увеличительная способность микроскопа определяется произведением увеличения окуляра и объектива. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают  $\times 1400$ . При превышении границ полезного увеличения происходит дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света.

## Иммерсионная микроскопия

При иммерсионной микроскопии (рисунок 2) работа объектива происходит в погруженном в однородную жидкую среду состоянии. При работе с сухим объективом вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,00) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. При работе с иммерсионным объективом необходимо поместить между покровным стеклом и линзой объектива кедровое масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.

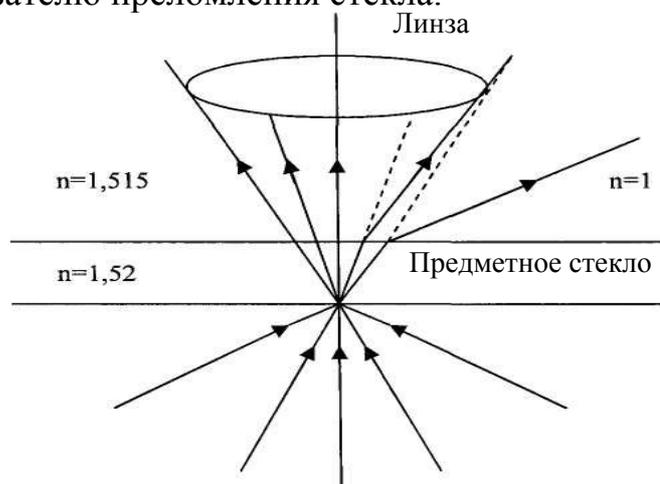


Рисунок 2 - Ход лучей в сухой и иммерсионной системах

## Другие виды микроскопирования

### Микроскопия в темном поле

В основе метода лежит эффект Тиндаля — рассеивающийся пучок света при наблюдении сбоку имеет вид голубоватого конуса на темном фоне. Другими словами, при освещении объекта косыми лучами света эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Поскольку лучи света идут именно от объектов, наблюдатель видит их в темном поле интенсивно светящимися.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным и применив источник сильного света. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в случае, если апертура конден-

сора превышает на 0,2 - 0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуют конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой 0,65 - 0,85. Важно обращать внимание на толщину предметных (0,8 - 1,2 мм) и покровных (0,17 мм) стекол, толщину препарата (в воде) и чистоту используемых стекол. Чем толще препарат и чем больше в нем посторонних частиц, преломляющих световые лучи, тем менее контрастно получаемое изображение, так как каждая частица, отражая лучи, освещает поле зрения.

Метод используется при исследовании живых клеток микроорганизмов. Он особенно ценен для функционально-морфологического изучения крупных объектов, например, дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) опалесцирует слабо и равномерно. На ее фоне четко различаются черные, оптически пустые вакуоли, капли жира в виде сильно блестящих гранул. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

### **Микроскопия с фазово-контрастным устройством**

Глаз человека различает световые волны по длине (цвет) и амплитуде (интенсивность, контрастность), но не различает их по фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через них, не меняют своей амплитуды, хотя и изменяются по фазе. Превратить «фазовый» (неконтрастный) препарат в «амплитудный» (контрастный) можно, либо окрашивая объект (для живых клеток этот прием малопригоден), либо снижая апертуру конденсора путем прикрывания диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижает разрешающую способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии разработан для наблюдения за прозрачными объектами. Он основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью определенного оптического устройства.

Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск — фазовую пластинку с кольцом (получается путем напыления диска солями редких металлов толщиной в несколько десятых микрометра), а в конденсор — кольцевую диафрагму (непроницаемую для лучей света пластинку с прозрачной щелью в виде кольца) так, чтобы через конденсор объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы восходящего светового луча сдвигаются (обычно на  $1/4$  длины волны), фазовые изменения переходят в амплитудные и препарат становится контрастным.

Для проведения исследований необходимо в дополнение световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (наиболее широко распространена модель КФ-4), которое состоит из фазовых объективов (на оправе имеется буква «Ф»), сенсоров с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

Метод применяют для исследования живых клеток микроорганизмов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в их физиологические процессы.

### **Люминесцентная или флуоресцентная, микроскопия**

Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной. При этом клетки будут светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Это собственная, или первичная, люминесценция.

Нелюминесцирующие объекты можно обработать специальными флуоресцирующими красителями - флуорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, тиофлавином, конго красным) и также наблюдать люминесценцию. Это будет наведенная, или вторичная, люминесценция.

Препараты, окрашенные флуорохромами, изучают в средах, не люминесцирующих под действием коротковолновых лучей: в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе.

Оптическая схема люминесцентного микроскопа отличается от оптической схемы обычного микроскопа источником света (можно использовать ртутную лампу, а если возможно возбуждение люминесценции объекта сине-фиолетовыми лучами, - то и низковольтные лампы) и наличием на пути лучей двух светофильтров: синего светофильтра перед конденсором, пропускающего сине-фиолетовые лучи видимого спектра, и желтого светофильтра в окуляре микроскопа, убирающего синие лучи, мешающие выявлению люминесценции.

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычной позволяет:

- сочетать цветное изображение и контрастность объектов;
- изучать морфологию живых и мертвых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- исследовать клеточные микроструктуры, избирательно поглощающие различные флуорохромы, являющиеся при этом специфическими цитохимическими индикаторами;
- определять функционально-морфологические изменения клеток;
- использовать флуорохромы при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Наиболее удобен для микробиологических исследований микроскоп люминесцентный МЛ-2.

### **Электронная микроскопия**

По схеме строения электронный микроскоп аналогичен световому, но освещение объекта обеспечивает не луч света, а поток электронов от вольфрамовой нити, нагреваемой электрическим током.

Разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет 0,2 — 0,4 нм, рабочее увеличение в среднем — 100 000 раз.

## **Трансмиссионный электронный микроскоп**

Трансмиссионный (от лат. transmissio — передача, переход) микроскоп широко применяют в биологических исследованиях.

Каждый электронный микроскоп состоит из электронной пушки (источник электронов); электромагнитных катушек, выполняющих роль конденсорной, объективной и проекционной линз; предметного столика; экрана для изображения и окуляра. Для работы микроскопа необходим вакуумный насос, так как движение электронов возможно только в вакууме. Электроны в трансмиссионном микроскопе движутся по такому же пути, как и лучи света в световом микроскопе.

Изображение объекта можно сфотографировать, если заменить флуоресцирующий экран (металлическую пластину, закрытую тонким слоем сульфида цинка или смеси сульфида цинка с селенидом кадмия) фотопластинкой.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки, на которые нанесена тончайшая пленка (подложка). Общая толщина препарата и подложки не должна превышать 0,25 мкм.

При изучении под электронным микроскопом морфологических особенностей клеток микроорганизмов исследуются целые клетки, для изучения ультраструктуры клеток — их срезы. Толщина срезов не должна превышать 0,8 - 0,9 мкм. Контрастность объекта обеспечивается напылением его тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) или обработкой различными контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом и др.).

## **Сканирующий, или растровый, электронный микроскоп**

Этот микроскоп дает объемное, почти трехмерное изображение исследуемого объекта. В сканирующих микроскопах подвижный тонкий электронный луч очень быстро и последовательно обегает поверхность исследуемого объекта по квадратному растру и передает полученную информацию на электронно-лучевую трубку, покрытую люминофором, светящимся под действием электронов. Глубина фокуса сканирующего микроскопа достигает нескольких миллиметров; пределы полезного увеличения — 10-15 тыс. раз, разрешающая способность меньше, чем у трансмиссионных электронных микроскопов.

Препараты для сканирующего микроскопа подвергают специальной обработке, основная цель которой — обезвоживание объекта без нарушения (сморщивания) поверхности структур. Затем препарат покрывают тонким слоем сплава золота или платины, что делает его поверхность электропроводной и позволяет избежать накопления электрического заряда, который может снизить разрешающую способность микроскопа.

## **Правила работы с микроскопом**

1 Приподнимая или перенося микроскоп следует брать его только за колонку тубусодержателя поддерживая другой рукой снизу за основание.

2 Проверять надежность крепления зеркала.

3 Приступая к микроскопированию, необходимо занять правильное положение.

4 До и после работы с микроскопом следует протирать оптические части мягкой тканью.

5 Конденсор должен быть поднят до уровня предметного столика и находится в центре окна столика. Перед началом работы следует открыть диафрагму.

6 При дневном освещении используют плоское зеркало, а при искусственном вогнутое. При этом следует направить световой поток в центр конденсора.

7 Изучение препарата начинают с осмотра его глазом, определяя зоны для микроскопирования, после чего препарат помещают в центр предметного столика и зажимают клеммами.

8 Осмотр препарата начинают на малом увеличении, для этого глядя на объектив сбоку макровинтом опускают его до уровня препарата, после чего глядя в окуляр начинают подъем объектива макровинтом до достижения резкости.

9 Для микроскопирования на большом увеличении на препарат наносят каплю иммерсионного масла, переключают револьвер на иммерсионный объектив. Фокусировку осуществляют согласно пункту 8. Для более точного наведения резкости используют микровинт.

10 По окончании работы объектив следует поднять, удалить с него следы иммерсионного масла и перевести в боковое положение. Если столик микроскопа загрязнен, его следует очистить. Конденсор следует опустить. Микроскоп отнести на место.

## **Лабораторная работа № 2 Иммерсионная микроскопия**

Цель работы – освоить иммерсионную микроскопию.

Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 1.

Таблица 1 - Протокол исследования

Исследуемый материал	Иммерсионная микроскопия	
	Рисунок	Способ окраски

### **1.2 Простые способы окраски микроорганизмов**

**Основные вопросы темы:**

- 1) особенности строения бактериальной клетки, основные органеллы;
- 2) основные признаки, отличающие прокариотические клетки от эукариотических;

- 3) строение клеточной стенки бактерий: особенности строения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, функция клеточной стенки;
- 4) L-формы, L-трансформация у бактерий;
- 5) строение цитоплазматической мембраны бактериальной клетки, ее функции.

Для изучения микроорганизмов в живом неокрашенном состоянии используют препараты «раздавленная» и «висячая» капля.

### **Лабораторная работа № 3 Приготовление препарата «раздавленная» капля**

Цель работы – освоить способ приготовления препарата «раздавленная» капля.

Методика выполнения работы.

На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей, выращенные в жидкой среде, — стерильной пипеткой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости необходимо удалить фильтровальной бумагой.

Препараты живых клеток микроорганизмов рассматривают, используя вначале малый объектив (x8 или x10), а затем микроскопируют с более сильным объективом (x40) при опущенном конденсоре и прикрытой диафрагме т.к. неокрашенные клетки лучше видны не в проходящем, а отраженном свете.

Результаты микроскопирования зарисуйте.

Методика приготовления препарата «висячая» капля.

Препарат «висячая капля» готовят следующим образом: каплю суспензии микроорганизмов петлей наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. Для длительных наблюдений используют стерильные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят в жидкой питательной среде.

Для количественного учета, изучения морфологии и особенно деталей строения микробных клеток (выявления спор, капсул, органоидов, включений и т.д.) необходимо зафиксировать и окрасить их.

### **Лабораторная работа № 4 Приготовление микропрепарата**

Цель работы – освоить приготовление микропрепарата.

Препараты из чистой культуры микроорганизмов используют для изучения их морфологии, анатомического строения, тинкториальных свойств.

Методика выполнения работы.

Приготовление препараты из агаровой культуры:

- 1) обозначить место нанесения материала стеклоглафом с обратной стороны стекла;
- 2) предметное стекло провести через пламя спиртовки (стерилизация). Рабочая поверхность обращена к пламени. Нанести на стекло петлю физиологического раствора;
- 3) стерильно извлечь из пробирки неполную петлю микробной массы;
- 4) эмульгировать бактерии в капле физиологического раствора на стекле до образования слегка мутной взвеси;
- 5) полученную взвесь распределить равномерным тонким слоем на поверхности стекла площадью в 1-2 копеечную монету;
- 6) прокалить петлю;
- 7) высушить препарат на воздухе;
- 8) зафиксировать препарат.

Различают физические и химические методы фиксации.

Физический метод - фиксации проводится в течение нескольких секунд через верхнюю часть пламени спиртовки (мазок должен быть сверху). Эту операцию проводится очень быстро, стараясь не перегреть мазок, чтобы избежать грубых изменений структурных элементов клетки.

Химические методы. Фиксацию микропрепарата ведут применяя:

- а) этиловый спирт в течение 10-15 минут;
  - б) ацетоном в течение 5 минут;
  - в) смесью равных объемов этилового спирта и эфира (по Никифорову) в течение 10-15 минут.
- 9) окрасить препарат.

### **Лабораторная работа № 5 Простой способ окраски бактерий**

Цель работы – освоить простой способ окраски бактерий.

Простой окраска позволяет быстро ознакомиться с общей морфологией микроорганизмов.

При простом способе окраски (применяется один краситель без дополнительных реактивов) применяют основные и кислые красители. Наиболее часто из основных красителей применяют:

- красные – нейтральный красный, сафранин, фуксин, гематоксилин;
- синие – виктория, метиленовый синий;
- фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый фиолетовый;
- зеленые – янус зеленый, метиленовый зеленый, малахитовый зеленый;
- коричневый – везувин, хризоидин;
- черные – индулин.

Из кислых красителей применяют:

- красные и розовые – кислый фуксин, эритрозин;
- черные – нигрозин;

- желтые – конго, пикриновая кислота, флуоресцин.

Основные красители более интенсивно связываются кислыми компонентами клетки.

Красители также подразделяются на позитивные и негативные. Позитивные красители окрашивают непосредственно клетки микроорганизмов. Негативные красители окрашивают пространство, окружающее клетки микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

Позитивный способ окрашивания.

1 На фиксированный препарат нанести раствор краски на 2-3 минуты.

2 Промыть препарат водой.

Просушить препарат фильтровальной бумагой.

Негативный способ окраски.

1 На предметное стекло нанести взвесь микроорганизмов или каплю физиологического раствора, в которую внести петлей микроорганизмы, снятые с агара.

2 В полученную взвесь микроорганизмов внести маленькую каплю туши, жидкость тщательно перемешать и равномерно распределить на стекле.

Высушить на воздухе или над огнем спиртовки.

Результаты работы зарисуйте в таблице 2.

Таблица 2 - Протокол исследования

Позитивный способ окраски		Негативный способ окраски
Фуксин	Метиленовая синяя	Тушь

### 1.3 Сложные способы окраски микроорганизмов

**Основные вопросы темы:**

- 1) жгутики, тонкое строение, таксисы, виды таксисов;
- 2) капсулы, чехлы, слизи, межклеточный матрикс, строение, функции;
- 3) генетический аппарат прокариотической клетки;
- 4) белоксинтезирующий аппарат прокариот;
- 5) метаболический аппарат прокариот, структура, функция;
- 6) запасные вещества и другие внутриклеточные включения.

**Лабораторная работа № 6 Сложный способ окраски микроорганизмов**

Цель работы – освоить сложные способы окраски микроорганизмов.

Сложные, или дифференциальные, способы окраски предназначены для детального изучения структуры клетки, характеристики и дифференциации изучаемых микроорганизмов от других. В отличие от простого метода окраски при сложных применяют не менее 2-х красителей и различные реактивы.

Сложный способ окраски, разработанный Кристианом Грамом в 1884 году, является самым универсальным из сложных способов окраски. Все бактерии по своему отношению к этому методу распределяются на две группы: грамположительные (фиолетового цвета) и грамотрицательные (красного цвета). Отношение к окраске по Граму является настолько важным опознавательным признаком бактерий, что обязательно упоминается в их характеристике.

Техника окраски по Граму.

1 Окрасить подготовленный фиксированный препарат раствором генциана фиолетового в течение 1-2 минуты.

2 Протравить препарат раствором Люголя – 1 минуту.

3 Обработать препарат спиртом – 30 секунд.

4 Смыть спирт водой.

5 Окрасить препарат водным фуксином – 1-2 минуты.

6 Смыть фуксин водой.

7 Просушить препарат фильтровальной бумагой или на воздухе.

Механизм окраски по Граму.

По данным, основанным на изучении физико-химического состава и структуры клетки, отношение к окраске по Граму обусловлено составом клеточной стенки микроорганизмов. У грамположительных бактерий муреин, составляющий каркас клеточной стенки многослоен и содержит полимер углеводной природы - тейхоевые кислоты. Таким образом, в клеточной стенке грамположительных микробов количественно преобладают полимеры полисахаридной природы, связанные с белками. Муреиновый каркас грамотрицательных бактерий однослоен, кроме того клеточная стенка этих микроорганизмов содержит относительно большое количество липидов в виде липопротеидов, фосфолипидов и липополисахаридов.

При окраске по Граму в клетках идет образование комплекса «генциан-виолет + йод». Этот комплекс нерастворим в воде и слабо растворим в спирте. При обработке этанолом он проходит через клеточную стенку грамотрицательных бактерий, вымывается из клеток, последние становятся бесцветными и докрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Клеточная стенка грамположительных бактерий, благодаря присутствию большого количества полисахаридов не пропускает комплекса «генциан-виолет + йод» и грампозитивные микроорганизмы остаются - сине-фиолетового цвета.

Приготовить микропрепарат из смеси бактерий, обладающей различными тинкториальными свойствами. Окрасьте микропрепарат по методу Грама. Затем исключите из окраски последовательно йод или спирт. Дайте объяснение механизма окраски по Граму, а также сделайте вывод о назначении каждого компонента.

Результаты зарисуйте в таблице 3.

Таблица 3 - Протокол исследования

Исследуемый материал	Ингредиенты окраски по Граму и время их действия	Назначение основных ингредиентов	Результаты (рисунки)		
			Окраски по Граму	Окраска по Граму без спирта	Окраска по Граму без Люголя

### Лабораторная работа № 7 Окраска кислотоустойчивых бактерий

Цель работы – освоить окраску кислотоустойчивых микроорганизмов.

Методика окраски по Цилю-Нильсону.

1 Окрасить фиксированный препарат фуксином Циля: Мазок покрыть белой фильтровальной бумагой, поверх которой нанести несколько капель карболового фуксина и подогреть над пламенем горелки 2-3 раза до появления паров, но не до кипения.

2 После охлаждения препарата снять бумажку и тщательно промыть мазок водой.

3 Обесцветить препарат 5 % серной кислотой – 15-30 с (при окраске спор – 0,5 % серной кислотой – 15 с).

4 Хорошо промыть водой.

5 Окрасить метиленовой синькой – 3-5 мин.

6 Хорошо промыть водой.

7 Просушить препарат фильтровальной бумагой или на воздухе.

Механизм окраски по Цилю-Нильсону.

Споры бактерий, окрашенных по методу Циля-Нильсена, выглядят рубиново-красными, вегетативные клетки – голубыми. Бактериальная спора имеет высококонцентрированную протоплазму и окружена плотной многослойной оболочкой, содержащей липиды и дипиколинат кальция. Карболовая кислота (фенол), входящая в состав фуксина Циля, является гидролизующим агентом, размягчающим оболочку споры. Размягчению способствует также повышенная температура. Фуксин, проникший в спору и окрасивший ее протоплазму, прочно удерживается ею и не обесцвечивается серной кислотой, протоплазма же вегетативных клеток обесцвечивается кислотой и докрашивается метиленовой синью.

Устойчивость некоторых микроорганизмов к кислотам связана с наличием в их клеточной стенке липидов и восковых веществ. По методу Циля-Нильсена кислотоупорные микроорганизмы (например, микобактерии туберкулеза) окрашиваются в красный цвет и не обесцвечиваются кислотой.

Результат зарисуйте.

## **2 Итоговое занятие по разделам «История развития микробиологии» и «Морфология микроорганизмов»**

- 2.1 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад отечественных ученых М.М. Тереховского, Д.С. Самойловича, И.И. Мечникова, Д.И. Ивановского, С.Н. Виноградского, З.В. Ермольевой в развитие микробиологии и вирусологии.
- 2.2 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, П. Эрлиха, А. Флеминга в развитие микробиологии.
- 2.3 Основные отличительные признаки прокариотических и эукариотических клеток. Формы бактериальных клеток, их особенности.
- 2.4 Различные методы микроскопирования микробиологических объектов (люминесцентная, фазово-контрастная, темнопольная, иммерсионная и электронная микроскопии).
- 2.5 Клеточная стенка микроорганизмов, действие на нее лизоцима и пенициллина. Техника и механизм окрашивания микроорганизмов по Граму. L- трансформация бактерий.
- 2.6 Особенности строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- 2.7 Цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток, строение, ее функции. Особенности строения цитоплазматической мембраны у археобактерий.
- 2.8 Капсулы, чехлы, слизи и межклеточный матрикс бактериальных клеток, структура и функции. Ворсинки, строение, функции.
- 2.9 Жгутики их расположение, функции и тонкое строение. Подвижность микроорганизмов - таксисы.
- 2.10 Генетический, белоксинтезирующий аппараты прокариотической клетки.
- 2.11 Структурная организация метаболического аппарата прокариот. Запасные вещества и другие внутрицитоплазматические включения.
- 2.12 Процесс спорообразования у микроорганизмов: экзо- и эндоспоры, свойства зрелых спор, продолжительность их жизни. Прорастание спор. Другие покоящиеся формы микроорганизмов.

## **3 Физиология роста микроорганизмов**

### **3.1 Питание микроорганизмов**

#### **Основные вопросы темы:**

- 1) потребности микроорганизмов в химических элементах и их источники;
- 2) питательные среды и условия роста микроорганизмов:
  - виды питательных сред;
  - диапазон, регуляция, и влияние рН на рост бактерий;
  - диапазон и влияние температуры на микробные клетки;
  - влияние гидростатического давления;
  - влияние кислорода на рост бактерий;

- создание аэробных и анаэробных условий;
- влияние влажности на рост бактерий;

### 3) типы питания микроорганизмов.

Многие из обнаруживаемых в природе микроорганизмов поддаются прямому выделению в чистую культуру. Для них легко подобрать условия, которые обеспечивали бы их рост. Однако есть много других микроорганизмов, относящихся к различным физиологическим группам, которые стали доступными для исследования лишь после того, как была разработана техника накопительных культур.

Накопительные культуры. Для накопления нужны такие условия, при которых данный организм преодолевает конкуренцию остальных. Подбирая ряд факторов (источники энергии, углерода, азота, акцепторы электронов, газовую атмосферу, освещенность, температуру, pH и т. д.), создают определенные условия и инокулируют среду смешанной популяцией, какая имеется, например, в почве или в иле. Наиболее приспособленный к такой среде микроорганизм растет и вытесняет все остальные, сопутствующие организмы.

Чистой культурой - называется популяция бактерий одного вида или разновидности, выращенная на питательной среде из одной единственной клетки (клон). Чистые культуры микроорганизмов выделяют на поверхности или внутри твердой питательной среды. Аэробные бактерии выделяют по методу Коха - рассеивают суспензию по поверхности среды в чашках Петри. Анаэробные бактерии суспендируют в расплавленном агаре (45 °С) и проводят инкубацию без доступа воздуха. После инкубации проводят тщательное отделение одной колонии.

Многие виды бактерий подразделяются по одному признаку на биологические варианты – биовары. Биовары, различающиеся по биохимическим свойствам, называются хемоварами, по антигенным свойствам - сероварами, по чувствительности к фагам – фаговарами.

Культуры микробов одного и того же вида, или биовара, выделенные из различных источников или в разное время из одного и того же источника, называются штаммами.

Колония представляет собой изолированное скопление бактерий одного вида, или биовара, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток.

Смешанные культуры. Естественные популяции это смесь различных микроорганизмов, с различными формами взаимодействий; это может быть конкуренция за общий субстрат, комменсализм или мутуализм. Для изучения этих и других форм взаимодействия все чаще используют смешанные культуры.

В домашнем обиходе и в промышленности применяют не только чистые, но и смешанные культуры. Некоторые из них назвали «естественными чистыми расами». Примерами могут служить кислое тесто, кефир, чайный гриб и «чистые расы» дрожжей. Большую роль смешанные культуры играют также при очистке сточных вод.

Методы выделения чистой культуры основаны на:

- 1) механическом разобщении бактериальных клеток;
- 2) предварительной обработке исследуемого материала с помощью физических или химических факторов, оказывающих избирательное антибактериальное

действие;

3) избирательном подавлении размножения сопутствующей микрофлоры физическими или химическими факторами во время инкубации посевов;

4) способности некоторых бактерий быстро размножаться в организме чувствительных к ним лабораторных животных.

### **Лабораторная работа № 8 Выделение чистой культуры методом механического разобщения бактериальных клеток**

Цель работы – научиться выделять чистую культуру микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

А Механическое разобщение с использованием микробиологической петли (рисунки 3, 4).

1 Для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Т, разделяющую дно на 3 сектора.

2 Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности агара в секторе 1, как показано на рисунке. Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают. Петлю стерилизуют в пламени и дают ей остыть (15 с).

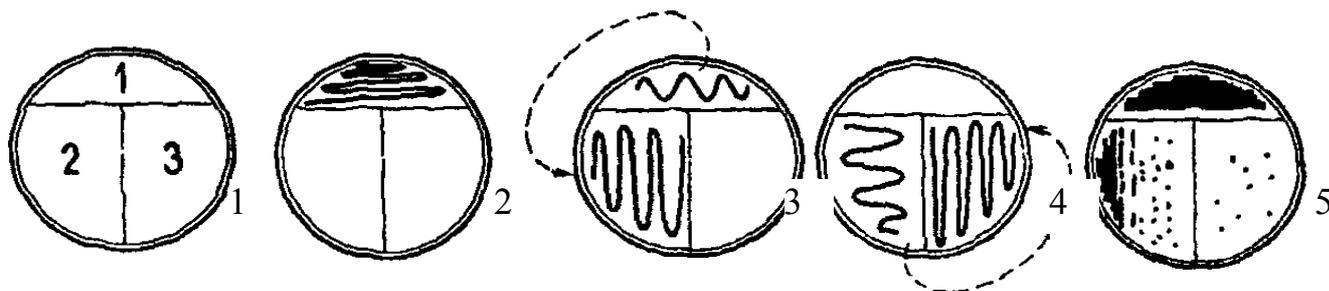


Рисунок 3 – Схема механического разобщения с использованием микробиологической петли

3 Проводят петлей по поверхности среды в секторе 1, как показано на рисунке, и затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 2. Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть.

4 Проводят петлей по поверхности среды в секторе 2, как показано, и затем наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 3.

5 Инкубируют опрокинутые вверх дном чашки Петри. В секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторах 2 и 3 появляются отдельные хорошо изолированные колонии.

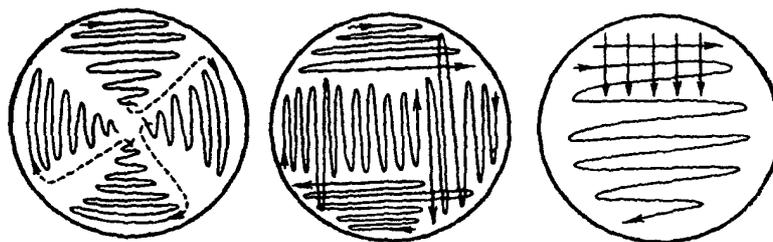


Рисунок 4 - Возможные схемы посева культуры микроорганизмов на поверхности плотной среды петлей

Б Механическое разобщение с использованием шпателя Дригальского.

На поверхность плотной питательной среды из пипетки наносят каплю накопительной культуры или её разведения в стерильной воде и стерильным шпателем Дригальского распределяют каплю сначала по одной половине затем по другой половине чашки Петри. Потом этим же шпателем последовательно протирают поверхность плотной питательной среды во 2-й, 3-й, 4-й чашках.

Для выращивания бактерий применяют различные питательные среды. Они могут быть жидкими, твердыми (лучше называть их плотными) или полужидкими.

Жидкие среды готовят на основе водных растворов каких-либо веществ, чаще всего мясной воды, различных гидролизатов, иногда жидких естественных продуктов (молока, крови и др.). Для получения плотных сред к ним добавляют или агар, или желатин, или силикагель в соответствующих концентрациях. Агар представляет собой полисахарид сложного состава, получаемый из морских водорослей. Он имеет плотную волокнистую структуру. Агар плавится при 100 °С, но при охлаждении сохраняет жидкую консистенцию до 45 °С. Для получения плотных сред его добавляют в концентрации 1,5 - 3,0 %. Полужидкие среды имеют вязкую консистенцию благодаря добавлению к ним небольшого количества агара (0,3 - 0,7 %). По своему происхождению среды делят на естественные (кровяные, молочные, картофельные, яичные) и искусственные, получившие особенно широкое распространение. Они представляют собой искусственные сбалансированные смеси питательных веществ в концентрациях и сочетаниях, необходимых для роста и размножения микроорганизмов. В них в качестве универсального источника азота и углерода для патогенных бактерий применяют пептоны — продукты неполного расщепления белков с помощью ферментов (пепсина), различные гидролизаты (рыбный, казеиновый, дрожжевой и т. п.). Питательные среды должны обязательно отвечать трем основным требованиям:

- 1) они должны содержать в достаточном количестве все необходимые питательные вещества (источники энергии, углерода, азота), соли и ростовые факторы;
- 2) должны иметь оптимальную рН для роста данного вида бактерий;
- 3) должны иметь достаточную влажность (при их усыхании повышается концентрация питательных веществ, особенно солей, до уровней, тормозящих рост бактерий).

Кроме того, питательные среды для лучшего определения культуральных свойств бактерий должны быть по возможности прозрачными. Наконец, они должны быть стерильными, не содержать посторонней микрофлоры. По назначению питательные среды подразделяют на следующие основные категории.

Универсальные — среды, на которых хорошо растут многие виды патогенных и непатогенных бактерий. К ним относятся: мясо-пептонный бульон (МПБ = мясная вода + 1 % пептона + 0,5 % NaCl), мясо-пептонный агар (МПА = МПБ + 2-3 % агара).

Дифференциально-диагностические - среды, позволяющие отличать одни виды бактерий от других по их ферментативной активности или культуральным проявлениям. К ним относятся среды Эндо, Левина, Плоскирева, Гисса и многие другие.

В состав дифференциально-диагностической среды входят:

- а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий;
- б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма;
- в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Селективные (синонимы: избирательные, элективные, обогатительные) - среды, содержащие вещества, используемые микроорганизмами определенных видов и не благоприятствующие или даже препятствующие росту других микроорганизмов. Селективные среды позволяют направленно отбирать из исследуемого материала определенные виды бактерий. Сюда относятся среды Мюллера, селенитовая, Раппопорт, 1 %-ная пептонная вода и другие.

Дифференциально-селективные - среды, сочетающие в себе свойства дифференциально-диагностических и селективных сред. Они используются, в частности, для ускорения обнаружения и идентификации бактерий, относящихся к большому числу широко распространенных видов энтеробактерий и псевдомонад (среды Сиволодского).

Специальные - среды, специально приготовленные для получения роста тех бактерий, которые не растут или очень плохо растут на универсальных средах. К ним относятся среды Мак-Коя - Чепина (для получения роста возбудителя туляремии), кровяной МПА (для получения роста патогенных стрептококков), среда Левенштейна-Йенсена (для выделения возбудителя туберкулеза) и другие.

Синтетические - среды строго определенного химического состава, представляющие собой растворы неорганических солей с добавлением химических соединений, которые служат источником углерода или азота. Примером такой синтетической среды является минимальная среда М-9, в которой источником энергии и углерода является глюкоза, а азота —  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Синтетические среды могут быть и более сложного состава с включением различных аминокислот, оснований и витаминов.

Полусинтетические - синтетические среды, к которым добавляют какой-либо продукт природного происхождения, например, сыворотку крови. Существует много различных вариантов питательных сред, сконструированных с учетом потребностей соответствующих видов бактерий и диагностических целей.

### **Лабораторная работа № 9 Изучение особенностей роста бактерий на висмут-сульфит агаре**

Цель работы – изучить рост бактерий на висмут-сульфит агаре.

Висмут-сульфит агар - строго селективная среда для выделения сальмонелл. Готовая среда непрозрачна, зеленовато-горохового цвета. Висмут-сульфит агар относится к плотным средам для выделения чистых культур.

Присутствие в среде бриллиантового зеленого и висмута (в виде основного сульфита) подавляют рост грамположительной флоры и многих энтеробактерий, в том числе шигелл.

Рост сальмонелл может задерживаться, вследствие чего чашки с посевами просматривают через 24 и 48 ч.

Дифференцирующее действие среды основано на том, что образуемый бактериями из сульфата железа сероводород вызывает почернение индикатора - бесцветного сульфита висмута - вследствие перехода его в сульфид висмута, вещество черного цвета. Поэтому бактерии, образующие сероводород, формируют совсем черные или черные с коричневым или темно-зеленым оттенком колонии, обладающие часто металлическим блеском. Среда под колониями при этом окрашена в черный цвет.

Бактерии, не образующие сероводород, могут вырастать в виде мелких бесцветных, зеленоватых или коричневых колоний.

Результат зарисуйте.

### **Лабораторная работа № 10 Изучение особенностей роста бактерий на агаре ЭНДО**

Цель работы – изучить рост бактерий на агаре Эндо.

Агар Эндо – слабоселективная дифференциально-диагностическая среда для выделения энтеробактерий. Среда Эндо относится к плотным средам для выделения чистых культур. Готовая среда прозрачна и имеет бледно-розовый цвет.

Принцип действия

Основным реактивом, важным для дифференциации, является основной фуксин, который обесцвечивается в среде при добавлении сульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). Присутствие в среде этих реагентов оказывает ингибирующее действие на грамположительную микрофлору.

Бактерии, способные ферментировать лактозу, изменяют рН среды в кислую сторону вследствие образования конечного продукта расщепления - ацетилальдегида. Последний, реагируя с сульфитом натрия, способствует появлению красного окрашивания. Поэтому лактозоположительные бактерии вырастают в виде ярко-розовых и красных колоний, часто с металлическим зеленоватым блеском.

Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, бесцветны или слабоокрашены. Результат зарисуйте.

### **Лабораторная работа № 11 Методы определения числа бактерий**

Цель работы – ознакомиться с методами определения числа бактерий.

Во время роста периодической бактериальной культуры может не быть строгой пропорциональности между увеличением числа клеток и увеличением бактериальной массы. Поэтому показатели эти необходимо различать.

Определение числа бактерий. В популяции бактерий не все клетки жизнеспособны. Живыми считаются те клетки, которые могут образовывать колонии на (или в) агаризованной среде либо суспензию в питательном растворе. Эти жизнеспособные клетки выявляют специальными методами, предназначенными для определения числа живых клеток. В общее же число клеток включают все видимые или иным способом выявленные клетки; сюда, следовательно, входят также мертвые или поврежденные клетки.

Общее число клеток.

1 Самым распространенным методом определения общего числа клеток служит их подсчет под микроскопом в тонком слое с помощью «счетной камеры» (например, по Нейбауэру, Тома или Петрову-Хаузеру). Если толщина слоя 0,02 мм, а сторона квадрата 0,05 мм (объем  $5 \cdot 10^{-8}$  см<sup>3</sup>), то для того, чтобы определить число клеток в 1 мл, следует найденное их число умножить на  $2 \cdot 10^7$ .

2 Значительно облегчает работу применение электронного счетчика («счетчика Каултера»). Действие его основано на снижении проводимости раствора электролитов при прохождении одной бактерии через узкое отверстие.

3 Если на 1 мл приходится менее  $10^6$  клеток, для определения их числа пригоден метод мембранных фильтров. Морскую, прудовую или питьевую воду пропускают через мембранный фильтр, а затем этот фильтр сушат, окрашивают, просветляют и производят подсчет клеток под микроскопом.

Число живых клеток.

Обычно подсчитывают число колоний, образуемых жизнеспособными клетками в благоприятных для роста условиях. Если пользуются чашечным методом Коха, то равные доли соответственно разбавленной гомогенной суспензии клеток смешивают с расплавленной агаризованной средой (40-45 °С) и выливают на чашки Петри. Можно также размазать суспензию по поверхности агара в чашке Петри с помощью (треугольного) шпателя Дригальского или же осадить клетки после фильтрования на агаризованную среду или на картонные диски с питательной средой. Во всех случаях после надлежащей инкубации подсчитывают число колоний. Эти методы непригодны для подсчета клеток разных видов микроорганизмов из смешанных популяций.

## **Лабораторная работа № 12 Определение бактериальной массы**

Цель работы – ознакомиться с методами определения бактериальной массы.

Выбор метода для определения бактериальной массы зависит от того, с какой целью это определение производится. Для оценки урожая обычно взвешивают сырые или сухие отцентрифугированные клетки. При определении интенсивности обмена или ферментативной активности исходят из содержания в клетках белка или азота. Часто выбор метода диктуется такими соображениями, как простота или быстрота работы. В повседневной практике предпочтение отдается не прямым, а косвенным методам (после соответствующей калибровки).

Прямые методы.

1 Сырую биомассу определяют после осаждения клеток центрифугированием. После центрифугирования отмытых клеток можно определить сухую массу. Метод не свободен от довольно больших систематических ошибок.

2 Большую точность обеспечивает определение общего азота (микродиффузионный метод определения аммиака), а также определение общего содержания углерода (по Ван Слайку-Фолчу).

3 В повседневной практике часто определяют содержание бактериального белка. Хорошие результаты дают колориметрические методы. Микрометоды основаны

на измерении количества характерных компонентов белка: тирозина, триптофана (по Лоури или Фолину).

Косвенные методы.

1 Для определения клеточной массы весьма полезны методы, основанные на измерении мутности клеточных суспензий. На практике обычно определяют оптическую плотность суспензии (измерение экстинкции, турбидиметрия). Для некоторых целей более точные результаты дает определение светорассеяния (нефелометрия).

2 Показатели интенсивности метаболизма, непосредственно связанные с ростом (поглощение  $O_2$ , образование  $CO_2$  или кислот), могут служить адекватной мерой бактериальной массы. К такому роду определений прибегают в тех случаях, когда другие методы оказываются непригодными, например: при очень малой плотности клеточных суспензий. Для измерения можно применять титрометрические, манометрические, электрохимические и другие методы.

## 3.2 Физиология роста

**Основные вопросы темы:**

1) рост бактерий в периодической культуре. Характеристика основных фаз кривой роста;

2) рост бактерий в непрерывной культуре. Культивирование в хемостате и турбидостате. Синхронизация клеточных делений;

3) подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов:

- повреждение ферментов и нарушение метаболизма;
- повреждение поверхностных структур или слоев клетки;
- нарушение синтеза клеточных компонентов;
- подавление синтеза белка антибиотиками;
- подавление синтеза нуклеиновых кислот антибиотиками;
- гибель и уничтожение микроорганизмов.

### **Асептика, антисептика**

Антисептика - комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс.

Различают антисептику:

1) механическая - удаление микробов путем иссечения ран, их промывание антисептическим раствором, выравнивание краев ран и, по показаниям, зашивание раны;

2) физическая - используются дренажи (из резиновых полосок и резиновых трубочек), марлевые тампоны; УФО;

3) химическая - используются антисептические, дезинфицирующие и химиотерапевтические средства;

4) биологическая - уничтожение микробов, повышение иммунной защиты организма.

Асептика - система профилактических мероприятий, направленных против возможного попадания микроорганизмов в ткани, органы, полости.

Пути попадания бактерий:

1) экзогенный - возбудители попадают в рану из внешней среды, окружающей больного;

2) эндогенный (аутоинфекция) - инфекция, которая содержится в организме больного и может проникнуть в рану - гематогенно - лимфогенно.

Стерилизация - метод, обеспечивающий гибель в стерилизуемом материале вегетативных и споровых форм патогенных и непатогенных микроорганизмов. Стерилизации должны подвергаться все предметы, соприкасающиеся с раневой поверхностью, контактирующие с кровью или инъекционными препаратами, а также отдельные виды диагностической аппаратуры, которые в процессе эксплуатации соприкасаются со слизистыми оболочками и могут вызвать их повреждение.

Микроорганизмы проявляют разную чувствительность к средствам, применяемым для их уничтожения. Существуют видовые различия в чувствительности, а также различия, зависящие от влажности и рН среды, от возраста вегетативных клеток или спор и т.д. Эффективность различных агентов, применяемых для уничтожения микроорганизмов, характеризуют величиной  $D_{10}$  (время, необходимое для того, чтобы в определенной популяции при определенных условиях среды вызвать гибель 90 % клеток).

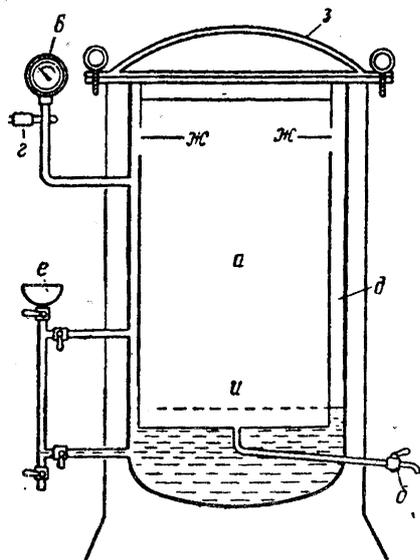
Полная или частичная стерилизация осуществляется с помощью:

- 1) насыщенного пара под давлением;
- 2) сухого жара;
- 3) фильтрации;
- 4) облучения;
- 5) различных химических средств.

### **Лабораторная работа № 13 Стерилизация насыщенным паром под давлением**

Цель работы – ознакомиться с устройством и работой автоклава.

Вегетативные клетки большинства бактерий и грибов гибнут через 5-10 мин уже при температуре около 60 °С, споры дрожжей и мицелиальных грибов - лишь при температурах выше 80 °С, а споры бактерий - выше 120 °С (15 мин). Время воздействия влажным жаром, необходимое для уничтожения спор некоторых видов бактерий, отличающихся чрезвычайной термоустойчивостью. При этом следует учитывать, что окончательный результат стерилизации зависит также от степени загрязнения обрабатываемого материала, т.е., например, от числа терморезистентных спор: чем их больше, тем длительнее должен быть нагрев. Для достижения температур выше точки кипения воды пользуются автоклавом. Температура насыщенного пара зависит от давления. При доступе воздуха определенному давлению соответствует значительно более низкая температура. Продолжительность стерилизации, естественно, зависит от объема (теплоемкости) сосудов, в которых ее проводят. Стерилизация насыщенным паром под давлением — наиболее быстрый и надежный способ стерилизации, ведущий к гибели самых устойчивых спор. Этим методом стерилизуют большинство питательных сред, посуду. Обработку насыщенным паром



*а* - стерилизационная камера; *б* - кран для выхода воздуха; *в* - манометр; *г* - предохранительный клапан; *д* - водопаровая камера; *е* - воронка для заполнения автоклава водой; *жс* - отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; *з* - крышка автоклава; *и* - подставка для размещения стерилизуемых материалов.

Рисунок 5 - Схема автоклава

проводят в герметически закрывающемся толсто-стенном котле — автоклаве (рисунок 5). На массивной крышке или сбоку котла есть кран для выхода пара, манометр и предохранительный клапан. Манометр показывает давление пара внутри котла. Для предотвращения взрыва при превышении предельного давления предохранительный клапан устанавливают так, чтобы дать выход пару.

Надежная стерилизация достигается нагреванием при 120 °С (давление 1 атм) в течение 20 мин (таблица 4).

Стерилизацию ведут следующим образом. Наливают воду в автоклав, помещают в него стерилизуемые предметы, завинчивают крышку и начинают подогрев. Кран оставляют открытым до тех пор, пока весь воздух, находящийся в автоклаве, не будет вытеснен парами воды. Когда пар начнет выходить из крана непрерывной струей, кран закрывают, доводят давление пара в автоклаве до 1 атм и поддерживают его на этом уровне в течение 20 - 30 мин. Затем нагрев прекращают, ждут, пока стрелка манометра дойдет до 0, осторожно открывают кран и спускают пар. Только потом отвинчивают крышку автоклава. Если кран будет открыт раньше, чем упадет давление, то жидкость в стерилизуемых сосудах закипит и вытолкнет из них пробки.

Широко применяется неполная или частичная стерилизация, т.е. уничтожение вегетативных форм микроорганизмов. Такого эффекта обычно достигают путем пастеризации - выдерживания в течение 5 - 10 мин при 75 или 80 °С. Пастеризацией частично стерилизуют, в частности, молоко; однако, чтобы не испортить его вкуса, время воздействия в этом случае сокращают. Применяют два метода пастеризации молока: кратковременное нагревание (20 с при 71,5-74 °С) и сильное нагревание (2-5 с при 85-87 °С).

Давление, Па	Температура, °С
$0,506 \cdot 10^5$ (0,5 атм)	115
$1,013 \cdot 10^5$ (1,0 атм)	120
$1,519 \cdot 10^5$ (1,5 атм)	127
$2,026 \cdot 10^5$ (2,0 атм)	133

Таблица 4 - Соответствие показателей манометра в физических атмосферах определенной температуре

Стерилизации молока добиваются в результате сверхсильного нагревания: При этом в молоко вводят перегретый водяной пар, доводя температуру смеси до 135-150 °С. Молоко подвергается действию этой температуры в течение 1 -2 с. Затем, пропуская молоко через форсунку, понижают давление и одновременно охлаждают молоко; при этом из него удаляется вода, введенная в виде пара.

Автоклав можно использовать и для дробной стерилизации в текучем паре при 100 °С. Жидкость стерилизуется в этом случае при 100 °С три дня подряд по 30 мин ежедневно; в промежутках между нагреваниями ее хранят в термостате, для того чтобы споры проросли, а затем вегетативные клетки были уничтожены при следующем нагревании. Подобный способ стерилизации называют – тиндализацией.

Способы консервирования ягод и косточковых плодов тоже следует рассматривать как частичную стерилизацию. При обычном нагревании консервных банок в течение 20 мин при 80 °С гибнут только вегетативные клетки и споры многих грибов, в то время как споры бактерий остаются жизнеспособными. Прорастанию бактериальных спор препятствуют низкие значения рН, обусловленные присутствием кислот во фруктовом соке. На пастеризованной клубнике часто появляется так называемый «клубничный гриб» *Byssochlamys nivea*. Его аскоспоры выдерживают 86 °С; при этой температуре  $D_{10}$  составляет 14 мин.

### **Лабораторная работа № 14 Стерилизация сухим жаром**

Цель работы – ознакомиться с устройством и работой сухожарового шкафа.

При стерилизации сухим жаром бактериальные споры переносят более высокие температуры и притом дольше, чем при стерилизации влажным жаром. Поэтому жаростойкую стеклянную посуду, порошки, масла и т. п. стерилизуют в течение 2 ч при 160°С в сухом стерилизаторе. В тех случаях, когда это позволяет стерилизуемый материал, в настоящее время применяют 30-минутный нагрев при 180°С. Как показывает опыт, при этом погибают все споры. Стерилизация жаром основана на коагуляции клеточных белков.

**Фильтрация.** Растворы, содержащие термолабильные вещества, удобнее всего стерилизовать фильтрованием. В лабораториях и для стерилизации питьевой воды используют фильтры Беркефельда (из прессованного кизельгура). Часто употребляют также асбестовые пластинки (в фильтрах Зейца), стеклянные фильтры и мембранные фильтры. Некоторые из них выпускаются с различной величиной пор, что позволяет даже разделять организмы разной величины и формы.

### **Лабораторная работа № 15 Стерилизация УФ-облучением**

Цель работы – изучить влияние УФ-облучения на культуру микроорганизмов.

Для полной или частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи. В спектре УФ-ламп преобладает излучение в области 260 нм, поглощаемое главным образом нуклеиновыми кислотами и при достаточно длительном воздействии вызывающее гибель всех бактерий. УФ-облучение использует

ся для частичной стерилизации помещений; при этом бактерии погибают очень быстро, а споры грибов, гораздо менее чувствительные к ультрафиолету, - значительно медленнее. Ионизирующее излучение применяют для стерилизации пищевых продуктов и других компактных материалов.

**Химические средства.** При стерилизации пищевых продуктов, лекарственных препаратов и разного рода приборов, а также в лабораторной практике оправдало себя применение окиси этилена, которая убивает и вегетативные клетки, и споры, но действует только в том случае, если подвергаемые стерилизации материалы содержат некоторое количество (5-15 %) воды. Окись этилена применяют в виде газовой смеси (с N<sub>2</sub> или CO<sub>2</sub>), в которой ее доля составляет от 2 до 50 %.

Для сохранения термолабильных веществ, содержащихся в питательных средах, в практику была введена стерилизация р-пропиолактоном. Он значительно активнее окиси этилена, но обладает, видимо, довольно сильным канцерогенным действием и вызывает ряд других побочных физиологических эффектов. Его добавляют в количестве 0,2 % в готовые питательные среды, которые затем инкубируют 2 ч при 37 °С. Если оставить среду на ночь, пропиолактон полностью разложится.

Углеводы при этом не затрагиваются. Напитки стерилизуют также диэтилпирокарбонатом (0,003-0,02 %).

Для стерилизации семян, используемых при выращивании стерильных растений, пригодны такие обычные антимикробные средства, как бромная вода (1 %), сулема (HgCl<sub>2</sub>; 1 %-ный раствор в спирте), AgNO<sub>3</sub> (0,05 %), гипохлорит кальция (1% Ca(ClO)<sub>2</sub>), уксусной и др., которыми воздействуют в течение 5-30 мин. Перед этим семена следует обработать мылом или другим поверхностно-активным веществом, чтобы обеспечить полное смачивание поверхности.

## Лабораторная работа № 16 Методы консервирования

Цель работы – ознакомиться с различными методами консервирования.

Пищевые продукты становятся негодными к употреблению не только в результате их разложения микроорганизмами (аэробного окисления или анаэробного гниения), но и вследствие того, что на них поселяются бактерии и грибы, образующие токсины. Важнейшими продуцентами токсинов, попадающими в пищевые продукты, являются *Clostridium botulinum* и различные виды стафилококков. *C. botulinum* выделяет экзотоксин, чрезвычайно сильно действующий даже в малых количествах и поражающий нервную систему. Стафилококки образуют энтеротоксин, вызывающий так называемые пищевые отравления. Некоторые грибы образуют микотоксины, из которых наиболее известен афлатоксин (продукт жизнедеятельности гриба *Aspergillus flams*).

Методы консервирования, применяемые для защиты пищевых продуктов от микроорганизмов, весьма разнообразны. Используются как физические, так и химические методы.

**Физические методы.** Выше упоминалось о стерилизации с помощью высокой температуры. Металлические консервные банки в большинстве случаев прогревают в автоклаве. Для консервирования кислых плодовых соков достаточно пастериза-

ции, при которой гибнут лишь вегетативные клетки, а споры сохраняют жизнеспособность; эндоспоры бактерий в кислых средах не прорастают.

Фруктовые соки, минеральные воды и лекарственные препараты стерилизуют, пропуская через мелкопористые асбестовые или целлюлозные фильтры. При производстве вина прибегают к центрифугированию и фильтрации, чтобы прервать брожение на нужной стадии (для сохранения «остаточного сахара»).

Старый и широко распространенный способ консервирования пищевых продуктов путем сушки основан на том, что для роста микроорганизмов необходима определенная влажность (обычно более 10 % воды). Овсяные хлопья, сушеные фрукты, сено, зерно в элеваторах сохраняются именно благодаря своему сухому состоянию; во влажном воздухе, отсырев, они быстро портятся под воздействием грибов и бактерий.

Возможности консервирования облучением пока еще ограничены. Ультрафиолетовые лучи используют главным образом для стерилизации воздуха на молочных заводах, промышленных холодильниках, хлебозаводах и в других аналогичных местах. Консервирование пищевых продуктов с помощью ионизирующих излучений в принципе возможно, так как эти излучения обладают высокой проникающей способностью; однако такой метод не получил еще широкого распространения. Надежным способом, начинающим даже в домашнем хозяйстве конкурировать с квашением и другими способами домашнего консервирования, является хранение продуктов при низкой температуре. В камерах для глубокого замораживания продукты хранят при температуре ниже минус 20 °С. При такой температуре жизнеспособность микроорганизмов заметно не снижается и разрушения их токсинов не происходит, однако рост полностью прекращается. Даже психрофильные бактерии не могут расти при температуре ниже минус 12 °С.

Химические методы. Консервирование путем подкисления основано на том, что при низких рН без доступа воздуха растут лишь немногие микроорганизмы. Для их уничтожения достаточно простой пастеризации. Термоустойчивые споры при рН ниже 5,0 не прорастают. Естественное подкисление, происходящее в результате молочнокислого брожения, используют для приготовления кислой капусты, силоса, соленых огурцов и сырокопченых колбас (салями, сервелата). Нередко для консервирования к продукту добавляют уксусную, молочную, винную или лимонную кислоту. При доступе воздуха непастеризованные кислые продукты разлагаются под действием дрожжей и других грибов.

Мясные и рыбные продукты консервируют копчением. Копчение связано с воздействием содержащихся в коптильном дыму продуктов возгонки - фенолов, крезолов, альдегидов, уксусной и муравьиной кислот. Все эти вещества обладают антисептическими свойствами. Действие их усиливается благодаря удалению из обрабатываемого продукта части влаги.

Для соления продукты помещают в 14-25 %-ный раствор поваренной соли. В результате снижается содержание воды в продукте и подавляется рост микроорганизмов, вызывающих порчу. Способность к размножению сохраняют в таких условиях лишь немногие галофильные бактерии.

Сахар в высокой концентрации (примерно 50 % сахарозы) также подавляет рост микроорганизмов. Мармелад и различные сиропы сохраняются в первую оче-

редь благодаря высокому содержанию кислот и сахара.

Для сохранения ряда пищевых продуктов приходится применять химические консерванты. К вину с этой целью ранее добавляли сернистую кислоту; вино и фруктовые соки можно (если это необходимо) консервировать добавлением диэтилпирокарбоната.

## **4 Итоговое занятие по темам «Систематика» и «Физиологии роста микроорганизмов»**

- 4.1 Современная таксономия: критерии идентификации микроорганизмов.
- 4.2 Различные системы классификации и виды.
- 4.3 Современная классификация микроорганизмов.
- 4.4 Потребности микроорганизмов в химических элементах и их источники.
- 4.5 Виды питательных сред
- 4.6 Условия роста микроорганизмов (рН, температура, гидростатическое давление, кислород, влажность).
- 4.7 Методы создания аэробных и анаэробных условий.
- 4.8 Типы питания микроорганизмов.
- 4.9 Характеристика клеточных циклов.
- 4.10 Рост бактерий в периодической культуре. Характеристика основных фаз кривой роста.
- 4.11 Рост бактерий в непрерывной культуре. Культивирование в хемостате и турбидостате. Синхронизация клеточных делений.
- 4.12 Подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов.

## **5 Физиология микроорганизмов**

### **5.1 Ферментативная активность микроорганизмов**

#### **Основные вопросы темы:**

- 1) способы поступления в клетку питательных веществ;
- 2) виды транспорта через клеточную плазматическую мембрану;
- 3) особенности пассивного и активного транспорта через клеточную мембрану;
- 4) современная классификация ферментов.

Многие микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов самые различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Однако макромолекулы не могут проникать через мембрану клетки. Они подвергаются расщеплению, которое осуществляется под воздействием экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Большинство из них катализирует гидролиз полимера до растворимых продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди различных

групп микроорганизмов. При поиске продуцентов ферментов - гидролаз в лабораторной практике применяют специальные методы. Сущность их состоит в следующем. Микроорганизмы выращивают на агаризованной среде, содержащей макромолекулярный субстрат. Если клетки выделяют в среду экзоферменты, гидролизующие данное соединение, то выросшие колонии окружены зоной, в которой обнаруживаются продукты гидролиза.

### **Лабораторная работа № 17 Амилолитическая активность микроорганизмов**

Цель работы – изучить действие амилолитических ферментов микроорганизмов на крахмал.

Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, активными продуцентами которых являются различные виды бацилл, псевдомонад, стрептомицетов и мицелиальных грибов.

Методика выполнения работы.

На поверхность стерильной среды, содержащей 0,2 % крахмала высевают исследуемые микроорганизмы штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2 - 10 суток. Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливают 3 - 5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизовался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряют в миллиметрах от края штриха (колонии) до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилолитическая активность.

Результаты зарисовать, зону гидролиза измерить.

Протеолитические ферменты (протеазы) катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и другими микроорганизмами. Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатин, казеин или другие белки.

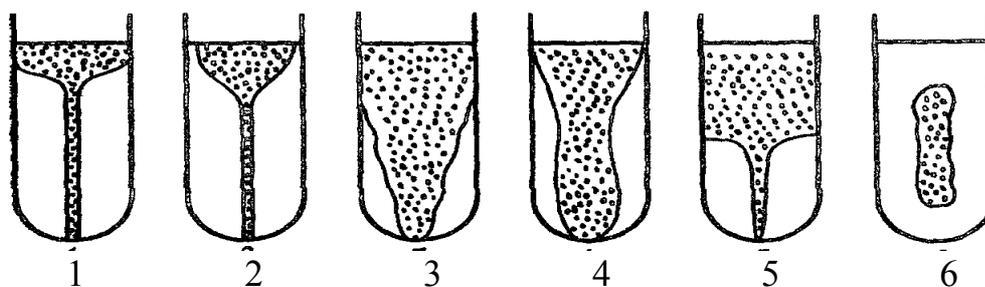
### **Лабораторная работа № 18 Протеолиз желатины микроорганизмами**

Цель работы – изучить протеолитическую активность микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

Микроорганизм высевают на мясо-пептонный желатин (МПЖ). Посев проводят уколом. Продолжительность культивирования 7 - 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины или его отсутствие отмечают визуально. Если желатина разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения - послойное, воронкообразное, мешковидное, пузыревидное и т. д. (рисунок 6).

Результаты зарисовать.



1 - кратеровидное; 2 - реповидное; 3 - воронковидное; 4 - мешковидное; 5 - по-  
 слойное; 6 - пузырьвидное. 1 - 3 и 5 - разжижение вызвано аэробами, 4 - факультативными анаэробами, 6 - анаэробами

Рисунок 6 - Схема разжижения желатинны микроорганизмами при посеве уко-  
 лом

## 5.2 Энергетический метаболизм. Брожение

### Основные вопросы темы:

- 1) фруктозо-1,6-бисфосфатный путь;
- 2) пентозофосфатный путь;
- 3) 2-Кето-3-дезоксиглюконоватный путь;
- 4) спиртовое брожение;
- 5) молочнокислое брожение;
- 6) пропионовокислое брожение;
- 7) брожение, вызываемое бактериями рода *Clostridium*;
- 8) смешанное брожение.

### Лабораторная работа № 19 Определение способности микроорганизмов к брожению

Цель работы – изучить способность микроорганизмов к брожению.

Методика выполнения работы.

Определение способности к брожению проводят на углеводно-пептонной среде с 1 % концентрацией углеводов и небольшим количеством пептона. В среду добавляют индикатор - бромтимоловый синий. Среду без углевода стерилизуют при 1 атм. Углеводы (глюкозу, сахарозу, лактозу) добавляют к стерильной расплавленной среде в виде растворов в дистиллированной воде, которые стерилизуют при 0,5 атм. Стерильную среду с углеводами разливают в стерильные пробирки слоем 5 - 6 см и после того, как она застынет, ее засевают исследуемым микроорганизмом. Посев делают уколом. Для каждого углевода используют две пробирки. После посева поверхность среды в одной пробирке заливают стерильным расплавленным парафином, смесью вазелинового масла и парафина (1:1), или водным агаром (1,5 г агара на 100 мл), слоем 1 - 2 см.

Продолжительность культивирования от 2 до 7 суток.

По окончании опыта регистрируют изменение рН среды по перемене цвета индикатора. Аэробные микроорганизмы, осуществляющие дыхание и не способные

к брожению, растут на поверхности среды только в пробирке без парафина и образуют небольшое количество кислот лишь в верхнем слое среды. В случае нейтрализации этих кислот продуктами разложения пептона в поверхностном слое среды наблюдается щелочная реакция. Микроорганизмы, способные сбраживать углеводы, растут и образуют кислоты в обеих пробирках, но кислотность в анаэробных условиях значительно выше, чем в первом варианте. Это хорошо заметно по изменению цвета индикатора. Если брожение сопровождается образованием газов, то происходит разрыв агаризованной среды.

Результаты записать в протоколе исследований (таблица 5).

Таблица 5 - Рост микроорганизмов в среде с углеводом (глюкоза, сахараза, лактоза)

	Пробирка № 1	Пробирка № 2
Рост в среде		
pH среды		
Газообразование		

### Лабораторная работа № 20 Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение лежит в основе силосования, квашения овощей, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр; кислый вкус черного хлеба определяется молочной кислотой. Это брожение вызывается группой молочнокислых бактерий, которая очень разнообразна и широко распространена в природе.

Молочнокислые бактерии обитают на поверхности растений, в молоке, на пищевых продуктах, в кишечнике человека и животных. Они имеют много общих признаков, важнейшие из них следующие: образуют молочную кислоту, положительно окрашиваются по Граму, обычно не образуют опор, неподвижны, кокки или палочки требовательны к источникам азота (многие не развиваются на простых синтетических средах), не образуют каталазу. Если на колонию молочнокислых бактерий на питательной среде нанести каплю 3 %-ного раствора перекиси водорода, выделения кислорода не наблюдается. Для изучения молочнокислого брожения чаще всего в качестве питательной среды используют молоко. В нем имеются все необходимые питательные элементы для развития молочнокислых бактерий. В этой среде могут хорошо развиваться и другие бактерии (таблица 6) (гнилостные, маслянокислые), однако молочнокислые быстро подавляют их развитие вследствие накопления молочной кислоты.

Таблица 6 - Критические значения pH для развития разных групп бактерий

Группа бактерий	pH
Молочнокислые	4,0 - 3,5
Маслянокислые	5,0 - 4,7
Гнилостные	5,5 - 5,0

Цель работы – изучить способность микроорганизмов вызывать молочнокислое и маслянокислое брожение.

Методика выполнения работы.

Молоко необходимо разлить в колбы объемом 100 мл приблизительно по 40 - 50 мл, закрыть их ватными пробками. Параллельно осуществляют второй вариант опыта. Разлив молоко в колбы, закрывают их ватными пробками, доводят молоко до кипения. Колбы с кипяченым и некипяченым молоком помещают в термостат при 30 °С.

Через 10 - 12 ч свежее (некипяченное) молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа. Сгусток получается вследствие того, что молочная кислота реагирует с казеинатом кальция и казеин выпадает в осадок.

В кипяченном молоке молочнокислые бактерии, поскольку они не образуют спор, погибают, споры же маслянокислых бактерий сохраняются. При инкубации в термостате они прорастают, осуществляют маслянокислое брожение лактозы. В результате реакции масляной кислоты с казеинатом кальция в этом варианте также выпадает казеиновая кислота. В дальнейшем она подвергается пептонизации; осадок переходит в кремовую жидкость с неприятным запахом масляной кислоты (запах пота) и прогорклым вкусом.

Из прокисшего молока готовят микропрепарат. Бактериологической петлей извлекают сгусток, размазывают его на предметном стекле очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (приблизительно 1:1), несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. При такой фиксации не только погибают и прикрепляются к стеклу бактерии, но и параллельно эфиром извлекается и удаляется жир. Это необходимо, потому что капли жира на препарате мешают окраске и микроскопированию. Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим в течение 2 - 3 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Метиленовый синий - лучший краситель для молочнокислых бактерий в молоке, так как он слабо окрашивает основной фон (казеин) и хорошо окрашивает клетки; получаются наиболее четкие препараты.

Полученный результат зарисовать.

В микропрепарате чаще преобладают мелкие округлые клетки *Streptococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки. Этот микроорганизм является возбудителем естественного скисания молока в наших широтах. Оптимальная температура его развития 30 °С. Он накапливает до 1 % молочной кислоты. Нередко в препарате наблюдаются тонкие палочки рода *Lactobacterium*, варьирующие в размере, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *Lactobacterium bulgaricum* - возбудитель естественного скисания молока в южных широтах. Оптимальная температура его развития 40 °С. Кислотоустойчив, накапливает до 3,5 % молочной кислоты. Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень, четырехугольные или овальные клетки которой отличаются от молочнокислых бактерий своими размерами.

Качественные реакции на молочную кислоту. Скисшее молоко отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Фильтрат используют для качественной реакции на молочную кислоту.

В коническую колбу емкостью 100 мл берут 5 мл фильтрата, добавляют 2 мл крепкой серной кислоты и нагревают при взбалтывании до начала кипения. Затем,

продолжая кипячение и помешивание, пипеткой по каплям приливают 5 мл 5 %-ного раствора  $\text{KMnO}_4$ , который обесцвечивается. В этих условиях молочная кислота переходит в уксусный альдегид.

Для распознавания уксусного альдегида быстро покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором  $\text{AgNO}_3$ . Аккуратно, чтобы не разорвать фильтровальную бумагу, прижимают ее к краям горла колбы, продолжая нагревание. Уксусный альдегид улетучивается и, реагируя с аммиачным раствором  $\text{AgNO}_3$ , вызывает почернение бумаги с серебристой побежалостью. Выделяется металлическое серебро.

Результат реакции учесть (таблица 7).

Таблица 7 - Протокол исследования

	Молоко некипяченое	Молоко кипяченое
Микроскопия		
Реакция на молочную кислоту		

### 5.3 Энергетический метаболизм. Дыхание

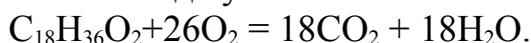
#### Основные вопросы темы:

- 1) аэробное дыхание, цикл Кребса;
- 2) аэробное дыхание: дыхательная цепь переноса электронов;
- 3) анаэробное дыхание.

#### Лабораторная работа № 21 Окисление жира микроорганизмами

Жир попадает в почву с растительными и животными остатками, с отмершими клетками микроорганизмов. Микроорганизмы, окисляющие жир, выделяют фермент липазу, который вызывает гидролиз жира.

Продукты гидролиза окисляются до углекислого газа и воды:



Цель работы – изучить способность микроорганизмов окислять жиры.

Методика выполнения работы.

В эрленмейеровскую колбу емкостью 100 мл наливают 30 мл не содержащую источника углерода - среду Рана (элективная минеральная среда). Затем добавляют одну треть чайной ложки почвы (для внесения возбудителей процесса). В качестве источника углерода добавляют жир - кусочек расплавленного свиного сала или говяжьего жира. Также можно добавить касторовое масло из расчета 1 мл масла на 30 мл среды. По мере развития жирокисляющих микроорганизмов прозрачное касторовое масло превращается в белые хлопья нерастворимых в воде жирных кислот.

Для микроскопических наблюдений готовится препарат с поверхности жирных кислот или из жидкости колбы. Сушат препарат при комнатной температуре, фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), удаляя одновременно остатки жира, затем красят фуксином.

Результаты исследования зарисовать.

При микроскопировании можно обнаружить неспороносную палочку типа *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, иногда на жире развиваются актиномицеты и грибы *Geotrichum candidum* (*Oidium tactis*).

## 5.4 Конструктивный метаболизм

### Основные вопросы темы:

- 1) биосинтез аминокислот и белков;
- 2) биосинтез нуклеиновых кислот;
- 3) биосинтез углеводов;
- 4) биосинтез липидов;
- 5) регуляция метаболизма;
- 6) регуляция синтеза ферментов: индукция и репрессия;
- 7) регуляция путем изменения каталитической активности ферментов

Уже в прошлом веке было известно, что между различными микроорганизмами могут существовать как симбиотические, так и антагонистические взаимоотношения. Толчком к выяснению материальной основы антибиоза послужило наблюдение Флеминга, обнаружившего (1928), что колония гриба *Penicillium notatum* подавляла рост стафилококков. Выделяемое этим грибом вещество, которое диффундировало в агар, получило название пенициллина. С тех пор было выделено множество веществ с антибиотической активностью. Антибиотики - это вещества биологического происхождения, способные даже в низких концентрациях подавлять рост микроорганизмов. Различают вещества, подавляющие рост микробов (бактериостатические, фунгистатические) и убивающие их (бактерицидные, фунгицидные и т.д.).

К синтезу антибиотиков способны главным образом грибы из группы *Aspergillales*, актиномицеты и некоторые другие бактерии. На первом месте по химическому многообразию синтезируемых веществ стоят стрептомицеты. К настоящему времени подробно охарактеризовано более 2000 антибиотиков, однако в качестве химиотерапевтических средств применяется всего лишь около полусотни. Число описанных случаев антибиотических взаимодействий гораздо больше, но многие группы микроорганизмов, в том числе не поддающиеся культивированию или с трудом культивируемые бактерии и низшие грибы, в этом смысле еще недостаточно изучены.

Вопрос о значении антибиотиков для их продуцентов в условиях их естественного обитания - в почве - остается неясным. К образованию антибиотиков ведут специальные биохимические пути, относящиеся к вторичному метаболизму. Эти пути и обеспечивающие их ферменты не являются необходимыми для роста и выживания клеток. Генетический аппарат, который нужен для синтеза антибиотиков, для организма в случае их бесполезности был бы балластом, и организм освободился бы от него в процессе эволюции путем соответствующих делеций. Поскольку в природе, очевидно, сохраняется лишь то, что целесообразно, нужно видеть в антибиотиках вещества, обеспечивающие их продуцентам селективное преимущество и в есте-

ственных условиях, т.е. в почве (например, преимущество в конкуренции за один и тот же субстрат). Однако такие антагонистические взаимоотношения в почве трудно обнаружить, поскольку антибиотики образуются в очень малых количествах; к тому же они обычно подавляют и рост самих продуцентов.

Постепенно утверждается представление, согласно которому в процессе эволюции может сохраняться и ненужный на первый взгляд генетический материал - даже в том случае, если в изученных до сих пор экспериментальных условиях он оказывается для организма балластом. Очевидно, природа более консервативна, чем это предполагалось на заре эры молекулярной биологии. В настоящее время антибиотики, а также другие вторичные метаболиты, прямую пользу которых для синтезирующих их клеток усмотреть трудно, причисляют, образно выражаясь, к «стружкам» обмена веществ или же к продуктам, возникшим на «игровой площадке» метаболизма. Этот пример ясно показывает, что изучение вторичного метаболизма бактерий, грибов и растений - одно из перспективных направлений в исследовании путей органической эволюции.

### **Лабораторная работа № 22 Методы выявления антибиотиков**

Цель работы – ознакомиться с методами выделения и выявления антибиотиков.

Первые антибиотики были обнаружены случайно, по образованию зон подавления роста. В чашках с питательным агаром, густо засеянном тест-организмом (индикаторными бактериями), вокруг колоний гриба или стрептомицета рост отсутствовал: антибиотик, диффундирующий из колонии в агар, вызывал образование прозрачных участков в сплошном бактериальном газоне (рисунок 7).

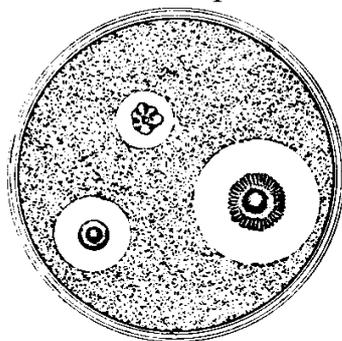


Рисунок 7 - Выделение антибиотиков бактериями или грибами можно обнаружить по образованию зон подавления роста индикаторных бактерий (*Staphylococcus aureus*), равномерно рассеянных на агаре

Видами - индикаторами (тест - объектами) в таких опытах служат типичные представители различных групп микроорганизмов. Для качественного испытания продуцента антибиотика достаточно посеять его в середину чашки с питательным агаром, а индикаторные бактерии - в виде радиальных штрихов (штрих-тест, рисунок 8). После инкубации по степени торможения роста различных индикаторных организмов судят о спектре действия антибиотика.



1 - Staphylococcus aureus; 2 - Streptococcus; 3 - Escherichia coli; 4 - Pseudomonas aeruginosa; 5 - Candida albicans; 6 - Trichophyton rubrum.

Рисунок 8 - Определение спектра действия трех антибиотиков с помощью штрихового теста

Антибиотики различаются по действию на грамположительные и грамотрицательные бактерии, на дрожжи, дерматофиты и другие микроорганизмы. Большинство антибиотиков было открыто в процессе предварительного отбора (скрининга). На рисунке 9 представлена вся последовательность работы - от получения суспензии почвенной пробы до опыта на животных.

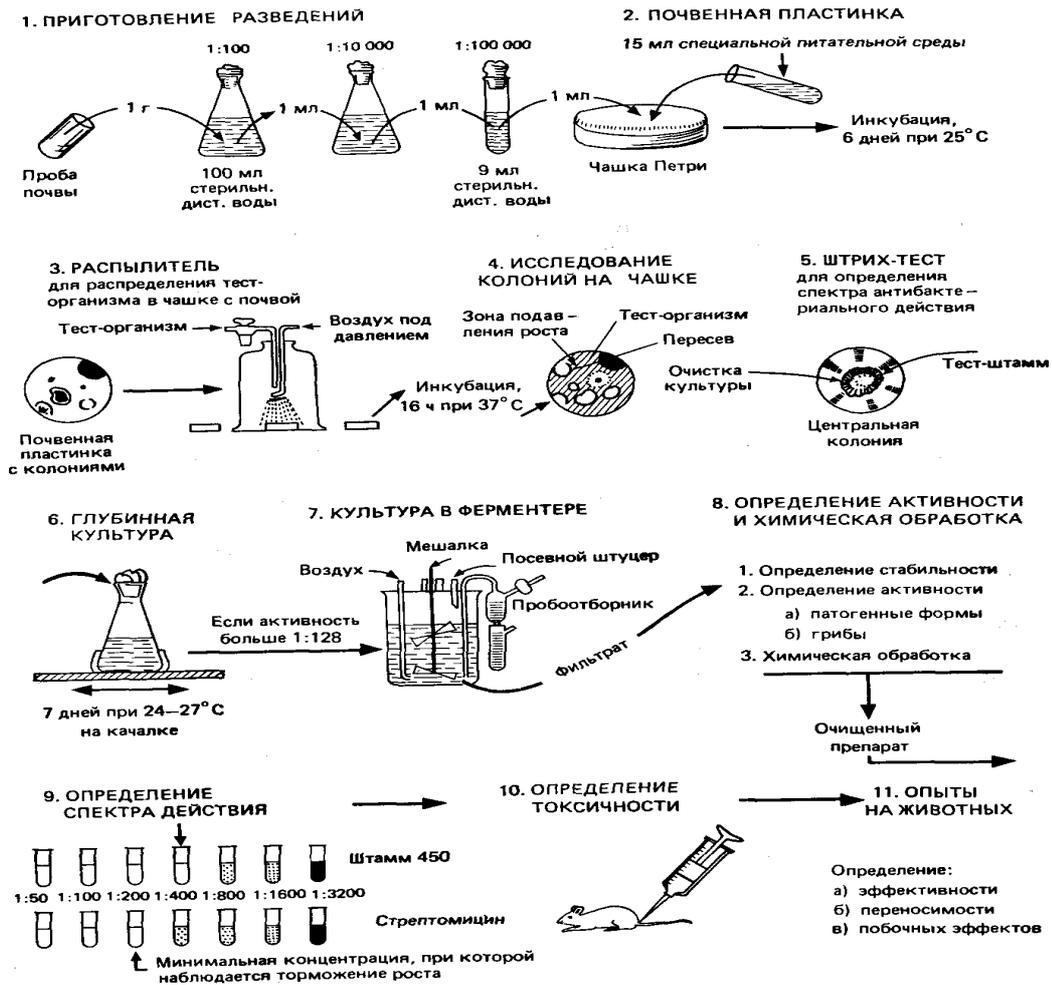


Рисунок 9 – План работы по отбору антибиотиков

В центр чашки Петри на агар с пептоном и гидролизатом казеина помещают диск из фильтровальной бумаги, пропитанный раствором испытуемого антибиотика (количество антибиотика ~ 10 мкг). Суспензии тест-организмов наносят платиновой петлей в виде радиальных штрихов (от одного до шести). В зоне диффузии антибиотика некоторые микроорганизмы не растут.

### Лабораторная работа № 23 Количественное определение действия антибиотиков

Цель работы – ознакомиться с количественной оценкой действия антибиотиков.

Для количественной оценки действия антибиотика пользуются методом диффузии в агар (рисунок 10), методом последовательных разведений и некоторыми другими методами. Для проведения теста с диффузией чашки заполняют до определенной высоты агаризованной средой, содержащей суспензию тест-организма. Затем в чашки вносят испытуемые растворы антибиотика. Их помещают в лунки, либо в стеклянный или металлический цилиндр, или же накладывают на агар пропитанные антибиотиком диски из фильтровальной бумаги. При положительной реакции во всех случаях после инкубации становится заметной зона подавления роста тест-организма. Диаметр этой зоны при соблюдении постоянных условий опыта (состав питательной среды, толщина слоя агара, плотность посева, время инкубации, температура и т.д.) пропорционален логарифму концентрации антибиотика (рисунок 10).

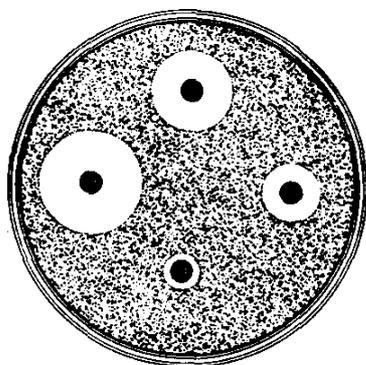


Рисунок 10 - Количественное определение антибиотика методом диффузии в чашке. Диски из фильтровальной бумаги, помещенные на поверхность засеянной агаризованной среды, содержат различные количества антибиотика. Диаметр зоны подавления роста тест-организма пропорционален концентрации антибиотика

При использовании метода последовательных разведений готовят серию разведений антибиотика в отношении 1:2 в питательном растворе, засеянном тест-организмом, и после инкубации определяют ту минимальную концентрацию антибиотика, при которой не наблюдается роста (*минимальную бактериостатическую концентрацию*).

Для установления синергического и антагонистического действия разных веществ, а также для исследования действия антибиотиков на другие организмы (на простейших, червей, водоросли, культуры клеток, вирусы) были разработаны специальные методы.

## 5.5 Разложение природных веществ

### Основные вопросы темы:

- 1) разложение бактериями целлюлозы: классификация ферментов, действие ферментов;
- 2) разложение бактериями крахмала и других  $\alpha$ -глюканов;
- 3) разложение бактериями гемицеллюлозы;
- 4) разложение бактериями хитина и хитозана;
- 5) разложение бактериями пектина;
- 6) разложение бактериями лигнина;
- 7) разложение бактериями, ДНК и РНК;
- 8) разложение бактериями липидов.

### Лабораторная работа № 24 Разложение белковых соединений

Разложение азотсодержащих органических соединений с выделением  $\text{NH}_3$  осуществляют аммонифицирующие микроорганизмы. Микроорганизмы, осуществляющие аммонификацию белковых веществ, выделяют в окружающую среду протеолитические ферменты (протеазы и пептидазы), под действием которых белки гидролизуются до аминокислот. Аминокислоты, поступая в клетку, дезаминируются.

Процесс аммонификации может происходить в аэробных и анаэробных условиях. При аэробном разложении азотсодержащих органических веществ образуются различные соединения:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , сульфаты, соли фосфорной кислоты. При анаэробном распаде - выделяются  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , меркаптаны, индол, скатол, кадаверин, путресцин, имеющие неприятный запах, спирты, органические кислоты.

Цель работы – изучить действие аммонифицирующих бактерий.

Методика выполнения работы.

Для выявления аммонифицирующих бактерий используют мясо-пептонный бульон, содержащий 3 % пептона, который наливают в пробирки по 9 мл и стерилизуют при 1 атм в течение 30 минут. Затем производят посев 1 мл почвенной суспензии из 10-кратных разведений (в 3-кратной повторности). После посева между пробиркой и горлышком пробирки закрепляют полоску стерильной красной лакмусовой бумаги и полоску фильтровальной бумаги, ранее смоченную насыщенным раствором уксуснокислого свинца. Бумажки не должны касаться среды. Чтобы затруднить улетучивание аммиака, сероводорода, меркаптанов и т.д., пробирку плотно закрывают целлофановым колпачком, закрепляя его резиновым колечком.

На 3-5 сутки инкубации при температуре 28-30 °С опыт заканчивают.

Наличие аммонификаторов определяют по образованию аммиака, сероводорода, меркаптанов и других продуктов белкового распада.

Для обнаружения возбудителей гнилостного распада белковых веществ приготовить препараты «раздавленная капля», окрашенные микропрепараты по Граму и Циль-Нильсону, полученные результаты зарисовать, отмечая подвижность, наличие или отсутствие спор.

Результаты зарисовать в таблице 7.

Таблица 7

Препарат «раздавленная капля»	Микропрепарат по Граму	Микропрепарат по Циль-Нильсену

Чаще других на препарате встречаются подвижные клетки *Proteus vulgaris*, преобладающие на первых стадиях распада белков. Это неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Кроме того, на препарате много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides* и *Clostridium putrificus*. У последних споры расположены терминально и диаметр их превышает ширину клетки.

*B. mycoides* вызывает аммонификацию белковых веществ в аэробных условиях, а *C. putrificus* - в анаэробных, но может также развиваться и в аэробных условиях, если в среде находятся аэробные микроорганизмы, поглощающие кислород.

Качественные реакции на продукты распада белка

Проба на аммиак. Выделяющийся в атмосферу аммиак улавливается при помощи подвешенной лакмусовой бумажки, которая при этом синееет.

Накопление аммиака в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера. Реакция капельная. На фарфоровую пластинку с лунками помещают каплю реактива Несслера и затем каплю культуральной жидкости. В контрольную лунку к капле реактива Несслера добавляют каплю МПБ + 3 % пептон. При большом количестве аммиака образуется коричневый или буроватый осадок; при небольшом количестве аммиака появляется оранжевая или жёлтая окраска.

Проба на сероводород. Его обнаруживают с помощью подвешенной фильтровальной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца  $[Pb(CH_3COO)_2]$ . При наличии сероводорода происходит почернение бумажки. Если она покрывается серебристым налётом, то это свидетельствует о том, что наряду с сероводородом выделяются ещё и меркаптаны (например, метил-меркаптан  $CH_3SH$ ).

Проба на индол. Выявление индола проводят по методу Грициана. В пробирку с 2 мл культуральной жидкости добавляют 10 капель реактива А (смесь 1 части формалина и 2 частей концентрированной серной кислоты) и после тщательного перемешивания 5 капель реактива В (0,5 %-ный раствор бихромата калия). При наличии индола через несколько секунд появляется розовая или вишневая окраска.

Полученные данные записать в таблицу 8.

Таблица 8

№	Проба на аммиак	Проба на сероводород	Проба на индол

## **5.6 Итоговое занятие по темам: «Энергетический метаболизм», «Конструктивный метаболизм», «Разложение природных веществ»**

- 5.6.1 Фруктозо-1,6-бисфосфатный путь.
- 5.6.2 Пентозофосфатный путь.
- 5.6.3 2-Кето-3-дезоксиглюконолатный путь.
- 5.6.4 Спиртовое брожение.
- 5.6.5 Молочнокислородное брожение.
- 5.6.6 Пропионовокислородное брожение.
- 5.6.7 Брожение, вызываемое бактериями рода *Clostridium*.
- 5.6.8 Смешанное брожение.
- 5.6.9 Аэробное дыхание, цикл Кребса.
- 5.6.10 Аэробное дыхание: дыхательная цепь переноса электронов.
- 5.6.11 Анаэробное дыхание.
- 5.6.12 Биосинтез аминокислот и белков.
- 5.6.13 Биосинтез нуклеиновых кислот.
- 5.6.14 Биосинтез углеводов.
- 5.6.15 Биосинтез липидов.
- 5.6.16 Регуляция метаболизма.
- 5.6.17 Регуляция синтеза ферментов: индукция и репрессия.
- 5.6.18 Регуляция путем изменения каталитической активности ферментов.
- 5.6.19 Разложение бактериями целлюлозы: классификация ферментов, действие ферментов.
- 5.6.20 Разложение бактериями крахмала и других  $\alpha$ -глюкоанов.
- 5.6.21 Разложение бактериями гемицеллюлозы.
- 5.6.22 Разложение бактериями хитина и хитозана.
- 5.6.23 Разложение бактериями пектина.
- 5.6.24 Разложение бактериями лигнина.
- 5.6.25 Разложение бактериями, ДНК и РНК.
- 5.6.26 Разложение бактериями липидов.

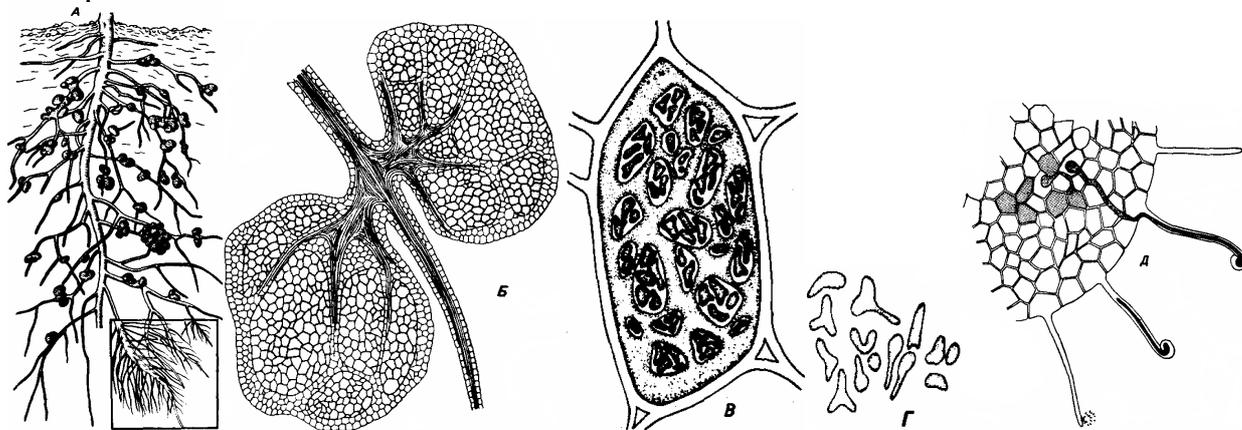
## **5.7 Фиксация молекулярного азота**

### **Основные вопросы темы:**

- 1) фиксация азота свободноживущими бактериями;
- 2) ассоциативная азотфиксация;
- 3) фиксация азота симбиотическими бактериями: характеристика клубеньковых бактерий и их видовая специфичность;
- 4) фиксация азота симбиотическими бактериями: взаимодействие бактерий с растением-хозяином, образование бактероидов;
- 5) фиксация азота симбиотическими бактериями: условия образования азотфиксирующей ассоциации;
- 6) фиксация азота симбиотическими бактериями у небобовых растений;
- 7) биохимия азотфиксации.

## Лабораторная работа № 24 Симбиотическая фиксация азота в корневых клубеньках бобовых

Цель работы – ознакомиться с взаимодействием бактерий рода *Rhizobium* с бобовыми растениями.



А - Корень гороха с клубеньками;

Б - Клубеньки в разрезе;

В - Растительная клетка, заполненная бактериями *Rhizobium* в разрезе;

Г - Бактерии, находящиеся в клетках растения, приобретают необычную форму (бактероиды);

Д - Внедрение бактерии через кончики корневых волосков и рост инфекционной нити.

Рисунок 11 – Схема симбиотической фиксации азота

## Лабораторная работа № 25 Выявление и учет азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*

Цель работы – освоить методику выявления и учета бактерий рода *Azotobacter*.

Небольшое количество почвы, увлажненной стерильной дистиллированной водой до пастообразного состояния растирают в чашке резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке. Далее бактериологической петлём или стеклянной палочкой берут небольшие комочки из приготовленной почвы и раскладывают их правильными рядами в шахматном порядке на поверхность агаризованной среды Эшби в чашках Петри.

Чашки помещают во влажную камеру, которую ставят в термостат при 28 - 30 °С на 6-8 суток.

О наличии азотобактера в исследуемой почве судят по образованию характерных колоний вокруг комочков почвы.

Образовавшиеся колонии рассмотреть, описать, изучить морфологию азотобактера (таблица 9).

На плотных средах (таблица 10) *Azotobacter chroococcum* растут в виде бесцветных (в молодом возрасте) густо-слизистых выпуклых капель, которые по мере

старения приобретают бурый, темно — коричневый или чёрный цвет. Для *Azotobacter agilis* характерны бесцветные колонии в любом возрасте. *Azotobacter vinelandii* образует желтовато — зелёного цвета флюоресцирующие колонии. Пигмент, выделяемый им, проникает в питательную среду.

Таблица 9

Описание колонии	Микроскопия	Вид микроорганизма

Таблица 10 - Особенности морфологии и место обитания микроорганизмов рода *Azotobacter*

Вид	Размер и форма клеток	Особенности колоний	Места обитания
<i>Azotobacter croococcum</i>	3.1x2 мкм; чаще парами	Слизистые, темноокрашенные; могут содержать цисты	Почва
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3,4x1,5 мкм; чаще парами	Крупные, слизистые; выделяют желтый пигмент с зеленой флуоресценцией; могут содержать цисты	Почва и вода
<i>Azotobacter paspali</i>	2 мкм, сильно плеоморфные	Пигмент как у предыдущего вида; могут содержать цисты	Почва, поверхность корней <i>Paspalum notatum</i>
<i>Azotobacter agilis</i>	3,3x2,8 мкм; поодиночке или парами	Выделяют желтый пигмент с белой флуоресценцией	Почва и вода

Процентное содержание азотобактера (X) рассчитывают по пропорции:

$$\begin{array}{l}
 a - 100 \\
 b - X
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 a \\
 X = \frac{a}{b} \cdot 100, \\
 b
 \end{array}$$

где a - общее количество комочков почвы;

b - число комочков с ростом азотобактера.

## 5.8 Аэробные кислородные фототрофные бактерии (цианобактерии)

### Основные вопросы темы:

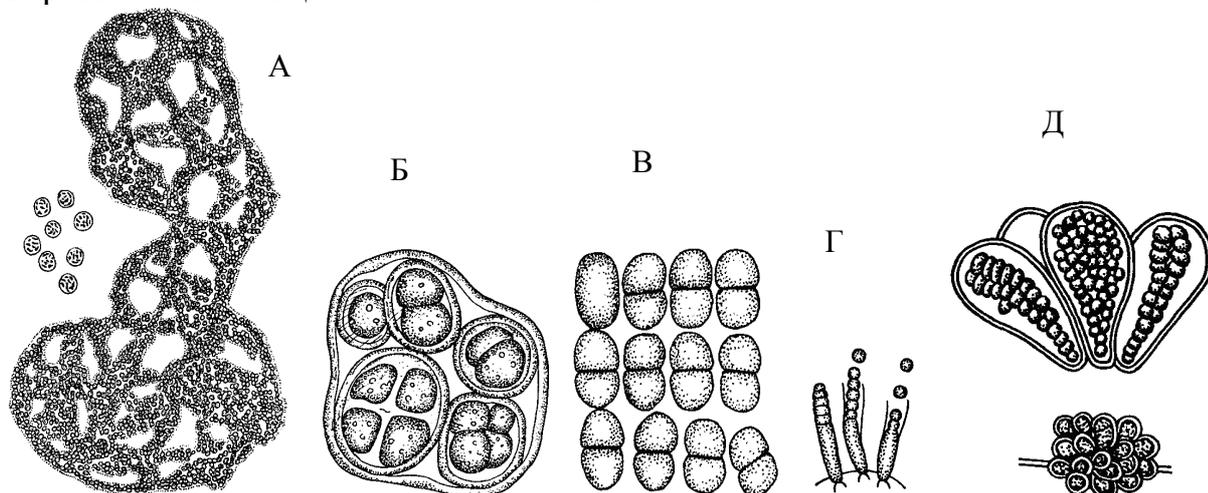
- 1) общая характеристика цианобактерий;
- 2) морфология цианобактерий;
- 3) особенности классификация цианобактерий;
- 4) специализированные клетки сине-зеленных водорослей;

- 5) строение фотосинтетического аппарата цианобактерий;
- 6) особенности метаболизма цианобактерий.

Классификация цианобактерий.

### Порядок хроококковые - *Chroococcales*

Порядок содержит одноклеточные и колониальные цианобактерии (рисунок 12), размножающиеся делением либо в одной, либо в двух-трех плоскостях, включая образование наноцитов и почкование.



*A* - *Microcystis* (общий вид колонии и отдельные клетки); *Б* - *Gloeocapsa*; *В* - *Merismopedia*; *Г* - *Chamaesiphon* (образование экзоспор); *Д* - *Dermocarpa*  
 Рисунок 12 - Хроококковые и плеврокапсовые синезеленые водоросли (М. М. Голлербах и др., 1953)

**Род прохлорон - *Prochloron*.** Этот одноклеточный представитель описан в 1976 г. как эндосимбионт колониальных асцидий рода *Didemnum*, обитающих в мангровых зарослях и коралловых рифах. Клетки имеют диаметр 6 - 30 мкм, размножаются бинарным делением. Имеются хлорофиллы *a*, *b* и хлорофилл *c*-подобный пигмент. Отсутствуют фикобилиновые пигменты. Тилакоиды собраны в граны. Некоторые формы способны фиксировать азот на свету.

**Род прохлорококкус - *Prochlorococcus*.** Этот одноклеточный коккоидный представитель - важный компонент океанического фитопланктона. Может быть обнаружен от поверхности и до глубины 250 м и более, куда проходит только 0,1 % света. Достигает максимальной концентрации  $7 \cdot 10^5$  клеток на 1 мл. Низкие температуры (ниже 10 °С) летальны для рода. Клетки эллипсоидные, ширина 0,5 - 0,6 мкм, длина 0,7 - 0,8 мкм. Имеет хлорофиллы *a*, *b*, некоторые штаммы - хлорофилл *c*-подобный пигмент; в небольших количествах присутствует фикоэритрин.

**Род микроцистис - *Microcystis*.** Эта колониальная водоросль широко распространена в пресноводном планктоне. Колонии сферической или неправильной формы, шаровидные клетки погружены в слизь. Клетки могут делиться в любых направлениях. Клетки многих видов содержат газовые вакуоли. Развиваясь в массе, может вызывать цветение воды. Некоторые виды токсичны.

**Род глеокапса - Gloeocapsa.** Водоросль образует колонии. Клетки овальной или эллипсоидной формы. Каждая клетка покрыта слизистым чехлом. При делении ослизняющиеся стенки материнских клеток сохраняются вокруг дочерних. В результате таких делений образуется сложная система вставленных друг в друга слоистых оболочек. Чаще всего чехлы бесцветные, но у некоторых видов окрашены в желтые или коричневые цвета. Встречается в пресных водах и в наземных условиях обитания (на влажных камнях, скалах, стенах), как фикобионт в некоторых лишайниках.

**Род мерисмопедия - Merismopedia.** Водоросль образует плоские таблитчатые колонии, образованные шаровидными клетками, делящимися только в двух направлениях. Преимущественно обитает в пресных водах, но встречается и в морях.

**Род хамесифон - Chamaesiphon.** Эта одноклеточная эпифитная водоросль широко распространена в пресных водах. Эллиптические клетки прикрепляются к субстрату основанием, покрыты слизистым чехлом, открытым на вершине. Размножается экзоспорами, отшнуровывающимися на вершине клетки и отпадающими по мере образования.

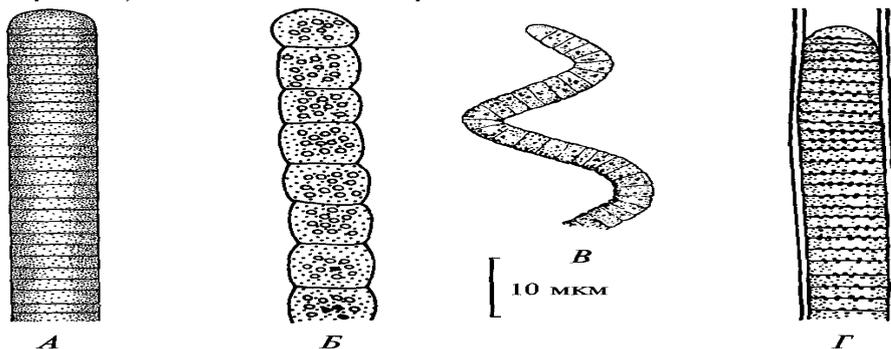
#### **Порядок плеврокапсовые - Pleurocapsales**

Порядок включает одноклеточных, колониальных и нитчатых (ветвящихся и неветвящихся) представителей (рисунок 12), которые размножаются беоцитами (эндоспорами).

**Род дермокарпа - Dermocarpa.** Эта водоросль представлена шаровидными, яйцевидными или булавовидными клетками, растущими часто группами. Беоцитов может быть четыре и более; освобождаются через разрыв стенки на верхушке материнской клетки; подвижные. Встречается как в пресной, так и в морской воде.

#### **Порядок осцилляториевые - Oscillatoriales**

Порядок включает (рисунок 13) многоклеточные гомоцитные одноосевые трихомы с влагалищем или без. Правильное ветвление отсутствует (фальшивое ветвление встречается редко). Размножение гормогониями.



А - Oscillatoria; Б - Trichodesmium; В - Spirulina; Г - Lyngbya

Рисунок 13 - Осцилляториевые синезеленые водоросли (М. М. Голлербах и др., 1953; R.E.Lee, 1999)

**Род прохлоротрикс - Prochlorothrix.** Эта водоросль - пресноводный представитель с гомоцитными нитями, состоящими из удлинённых клеток. Имеет хлорофиллы а и b. Хорошо растет на минеральных средах.

**Род осциллятория - *Oscillatoria*.** Нитчатая водоросль широко распространена в морях, пресных водоемах, горячих источниках и наземных местообитаниях. Трихомы цилиндрические, свободноживущие, гомоцитные, отсутствуют хорошо развитые слизистые чехлы. Размножаются с помощью гормогониев, нить распадается по «жертвенным» клеткам. Некоторые штаммы способны фиксировать азот. Характерно своеобразное колебательное (осцилляторное) движение, сопровождающееся вращением вокруг своей оси и ее поступательным движением. В последние годы проведена ревизия рода, и многие представители выделены в новые роды - *Planktothrix*, *Limnothrix*, *Tychonema*, *Trichodesmium*.

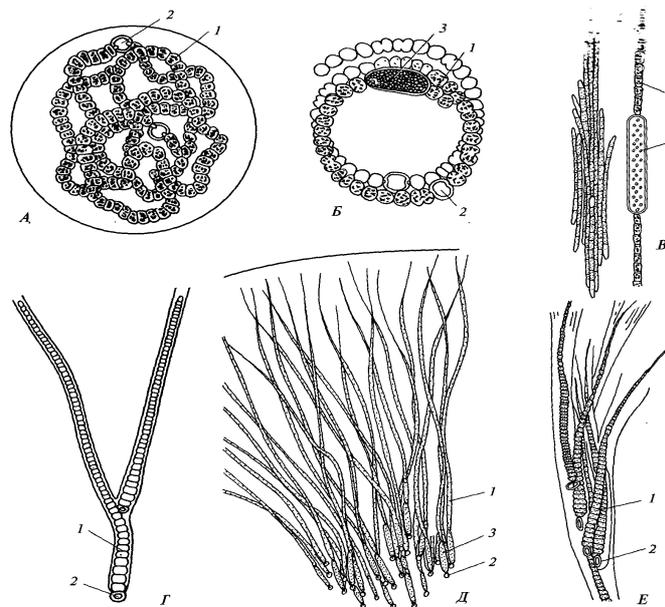
**Род триходесмиум - *Trichodesmium*.** У триходесмиума нити гомоцитные, формируют колонии, видимые невооруженным глазом. Это обычный представитель в открытом океане в субтропических и тропических широтах, может вызывать видимые приливы. Осуществляет значительный вклад в фиксацию азота в океане (порядок фиксации сравним с фиксацией бобовыми растениями).

**Род спиролина - *Spirulina*.** По внешнему виду спиролина близка к осциллятории, имеет гомоцитные трихомы, скрученные в правильную спираль; поперечные перегородки не видны при световой микроскопии. Встречается в морских и пресных водах, включая содовые озера. Активно культивируется в ряде стран.

**Род лингбия - *Lyngbya*.** Нитчатая водоросль широко распространена в морях и пресных водах. Трихомы гомоцитные, покрыты плотным слизистым чехлом, неподвижные. Размножение подвижными гормогониями. Некоторые штаммы способны фиксировать азот.

#### Порядок ностоковые - *Nostocales*

Порядок (рисунок 14) включает одноосевые трихомы с чехлами или без чехлов, с гетероцистами и/или акинетами, без настоящего ветвления. Размножение гормогониями.



А - *Nostoc* (молодая колония); Б - *Anabaena*; В - *Aphanizomenon* (слева - колония, справа - отдельный трихом); Г - *Calothrix* Д - *Gloeotrichia*; Е - *Rivularia*; 1 - вегетативная клетка; 2 - гетероциста; 3 - акинета

Рисунок 14 - Ностоковые синезеленые водоросли (М.М.Голлербах и др., 1953; Н.В.Кондратьева, 1988; В.Fott, 1956)

**Род носток - Nostoc.** Колонии этой водоросли макроскопические до 1 см в поперечнике, реже достигающие размера сливы или куриного яйца; шаровидные, эллипсоидные, позднее у многих видов расплостертые; снаружи плотные, хрящеватые, внутри студенистые. В центре слизи располагаются извитые неветвящиеся нити, состоящие из бочонкообразных вегетативных клеток, более крупных спор и блестящих гетероцист. Акинеты часто собраны в цепочки. Размножение гормогониями. По внешнему виду гормогонии отличаются от зрелых трихомов отсутствием гетероцистов, более быстрым движением, меньшими размерами и формой клеток, количеством газовых вакуолей. Встречается носток в пресных водах и на почве. Некоторые представители вступают в симбиоз с растениями, являются компонентом лишайников.

**Род анабена - Anabaena.** Трихомы близки по внешнему виду к ностоку, но не объединены в оформленные слизистые колонии. Гетероцитные нити прямые или изогнутые, состоят из округлых клеток. Гетероцисты интеркалярные или терминальные. Размножение гормогониями, не отличающимися по внешнему виду от зрелых трихомов. Виды рода, широко распространяясь в пресных водоемах, могут вызывать «цветение воды». Анабена вызывает также «цветение воды» в Балтийском море. Некоторые штаммы токсичны. Род немонофилетичный, нуждается в ревизии, недавно из него был выделен род *Trichormus*.

**Род афанизоменон - Aphanizomenon.** Водоросль с гетероцитными, прямыми трихомами. Формирует колонии из пучков нитей без слизистой обертки. Вызывает летнее цветение воды в пресных водоемах и в Балтийском море. Образует токсин цилиндроспермопсин. Род немонофилетичный.

**Род калотрикс - Calothrix.** У калотрикса трихомы гетероцитные бичевидные (уменьшающиеся по толщине от основания к периферии); на расширенном конце расположена базальная гетероциста, противоположный конец вытянут в волосок. Трихом одет чехлом, ветвление ложное. У некоторых видов известны споры. Обитает на камнях в морских и пресных водах. Некоторые виды входят в состав морских лишайников из рода лихина (*Lichina*).

**Род ривулярия - Rivularia.** Колониальная водоросль с гетероцитными бичевидными трихомами, часто заканчивающимися бесцветным волоском. В основании каждой нити имеется гетероциста. Встречается фальшивое ветвление, нити покрыты слизистыми чехлами. В слизистых колониях нити расположены радиально. Встречается в пресных водах и на морских побережьях.

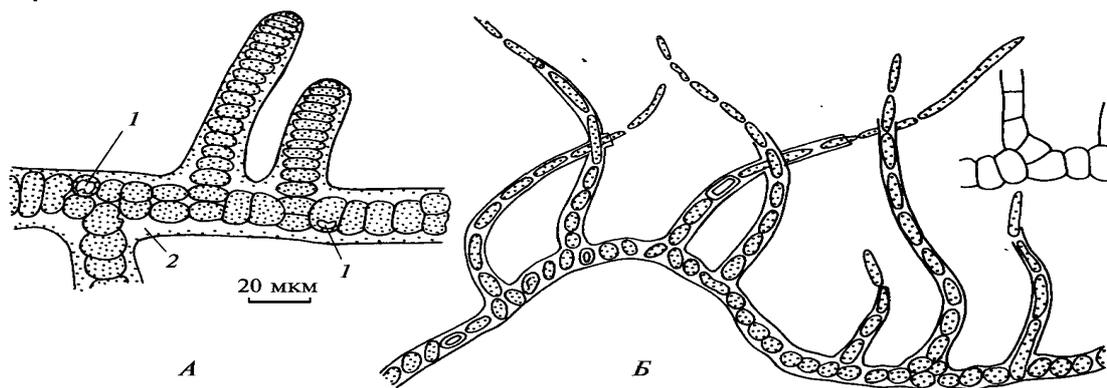
**Род глеотрихия - Gloeotrichia.** Колонии студенистые, шаровидные или бесформенные, прикрепленные или свободно плавающие. Бичевидные нити внутри колонии располагаются радиально, более широким концом (с гетероцистой и спорой) обращены к центру шара. Спора длинная, образована за счет слияния нескольких клеток. Встречается в пресных водах.

#### **Порядок стигонемовые - Stigonematales**

Порядок (рисунок 15) включает одноосевые и многоосевые гетероцитные трихомы с истинным ветвлением. Размножение гормогониями.

**Род стигонема - Stigonema.** Трихомы гетероцитные, состоят из нескольких рядов клеток, ветвление истинное, всестороннее. Влагалища широкие, нередко слоистые. Клетки большей частью шаровидные или бочонковидные. Гетероцисты боковые и интеркалярные. Споры редки. Встречаются в пресных водах и на влажных скалах и почве в виде кустистых, подушкообразных и корковидных дерновинок. Некоторые представители входят как фикобионт в лишайники.

**Род мастигокладус - Mastigocladus.** Таллом сложноветвящийся, гетероцитный. Ветвление истинное и ложное. Клетки основных нитей более или менее шаровидные, клетки ветвей удлинленно-цилиндрические. Влагалища узкие, крепкие или ослизняющиеся. Гетероцисты интеркалярные, споры не известны. Широко распространен в термальных источниках.



А - Stigonema; Б - Mastigocladus: 1 - гетероциста, 2 - чехол

Рисунок 15 - Стигонемовые синезеленые водоросли (R.E.Lee, 1999; М.М. Голлербах и др., 1953)

## Лабораторная работа № 26 Идентификация сине-зеленых водорослей в пробе природной воды

Цель работы: получить навыки работы с «Определителем бактерий Берджи» и идентифицировать цианобактерии.

Изучить пробу природной воды и идентифицировать цианобактерии используя «Определитель бактерий Берджи». Результаты зарисовать.

### 5.9 Фототрофные бактерии и фотосинтез

#### Основные вопросы темы:

- 1) отличительные особенности морфологии и физиологии пурпурных и зеленых бактерий;
- 2) пигменты фотосинтетического аппарата фототрофных бактерий;
- 3) особенности метаболизма и распространения фототрофных бактерий:
  - фиксация  $\text{CO}_2$ ;
  - доноры водорода;
  - образование молекулярного водорода на свету;
  - темновой метаболизма;
  - распространение фототрофных бактерий.

- 4) основные этапы оксигенного фотосинтеза;
- 5) аноксигенный фотосинтез.

На рисунке 16 представлены некоторые виды фототрофных зеленых бактерий.

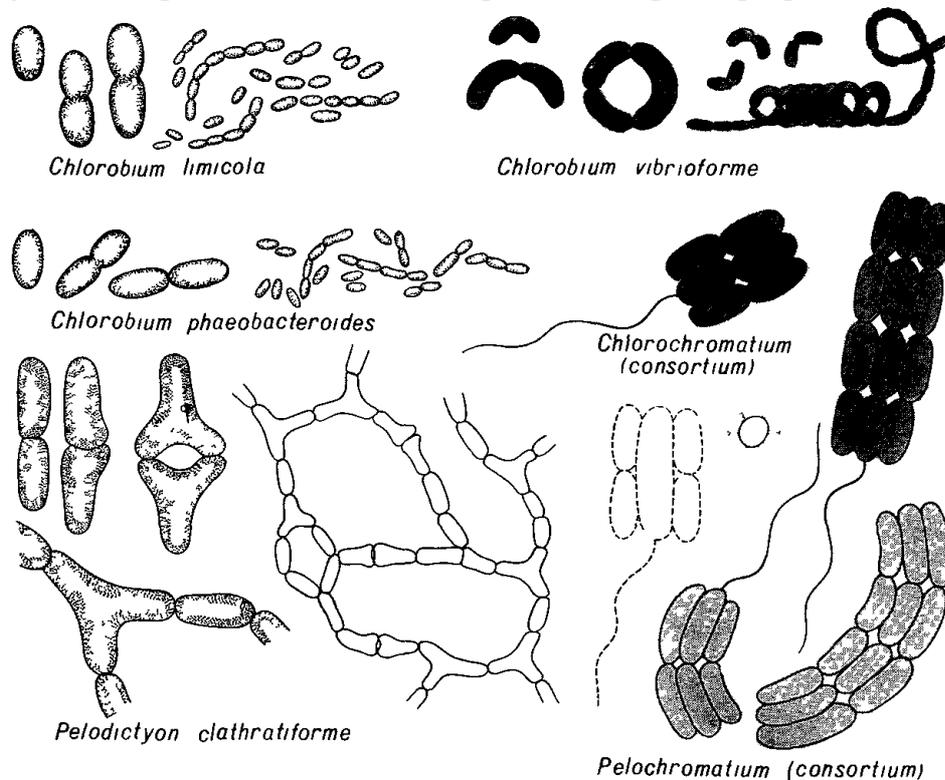


Рисунок 16 - Морфологические особенности фототрофных зеленых бактерий (Chlorobiales)

На рисунке 17 представлены некоторые виды фототрофных пурпурных бактерий.

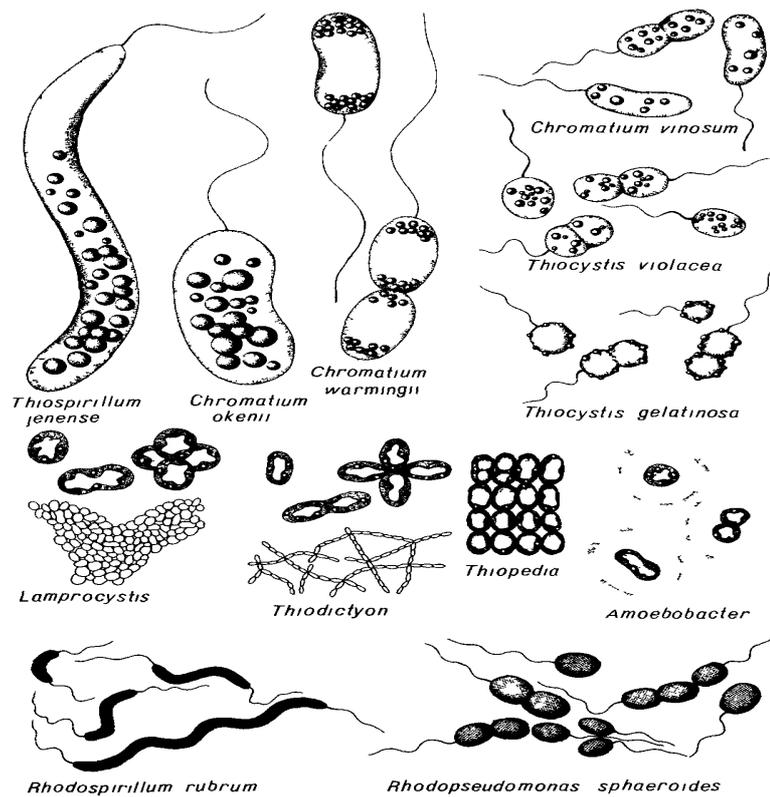
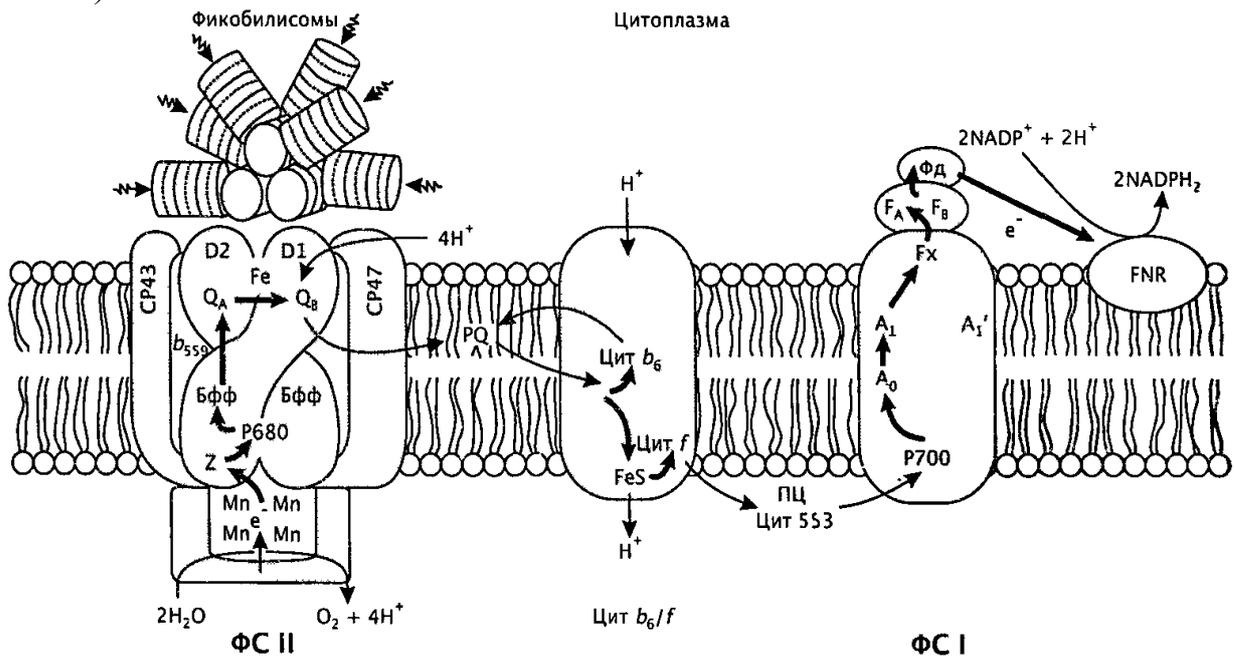


Рисунок 17 - Морфологические особенности пурпурных бактерий (Rhodospirillales)

**Лабораторная работа № 27 Схема фотосинтетического аппарата цианобактерий (оксигенного фотосинтеза)**

Цель работы – ознакомиться и изучить работу фотосинтетического аппарата аэробных оксигенных фототрофных бактерий.

Фотосинтетический аппарат цианобактерий, состоит из двух фотосистем (рисунок 18.)



Фотосистема II (ФС II) получает энергию от прикрепленных к цитоплазматической стороне мембраны фикобилисом и небольшой антенны, содержащей Хл а

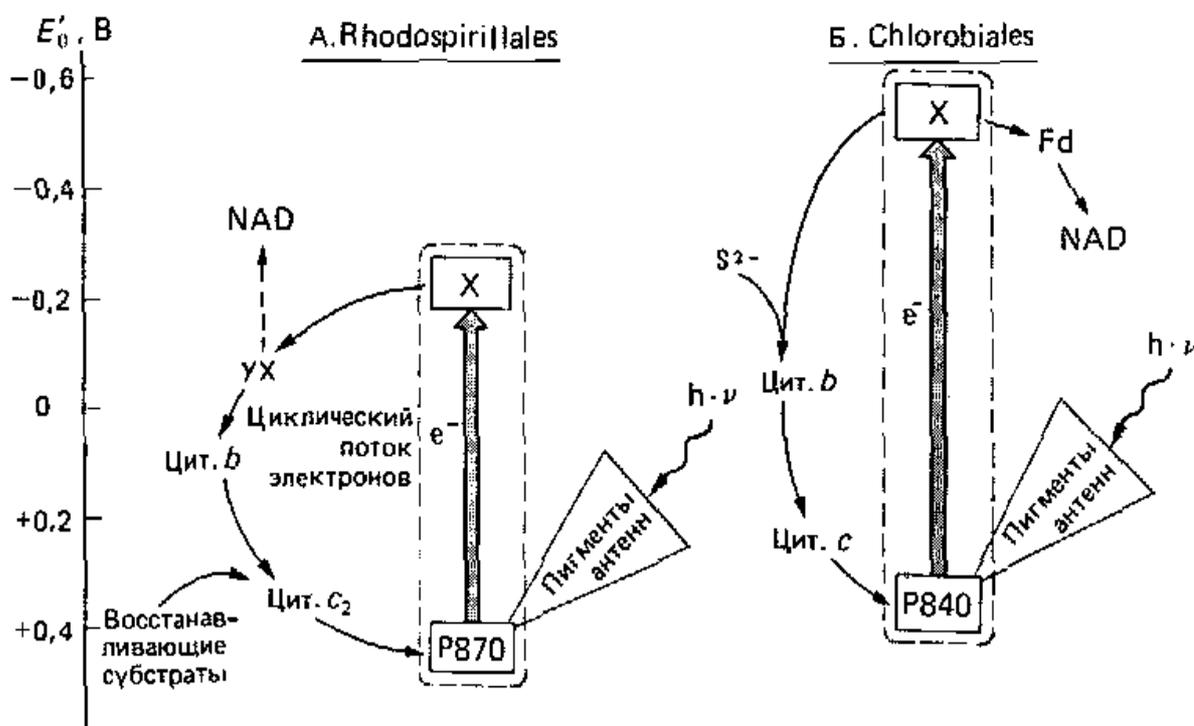
(CP43, CP47). Система фотолиза воды в ФС II расположена на внутренней стороне тилакоидной мембраны. Пластохиноны (Пх) мембранного пула связывают ФС II и комплекс цитохромов  $b_6/f$ , выполняющий, подобно комплексу цитохромов  $b/c_1$ , функцию протонной помпы. D1 и D2 белки, образующие гетеродимер.  $Q_A$  и  $Q_B$  хиноны связанные с белками D1 и D2. Пластоцианин (ПЦ) или цитохром  $c_{553}$  осуществляет перенос электронов между  $b_6/f$ -комплексом и фотосистемой I (ФС I) - пластоцианин:ферредоксин-оксидоредуктазой. P700 - первичный донор электронов (Хл а);  $A_0$  - первичный акцептор электронов;  $A_1$  (хинон) - промежуточный акцептор электронов; FeS - Fe-S-кластер;  $F_A$  и  $F_B$  (Fe-S-кластеры) - конечные акцепторы электронов в РЦ. Структура ФС I цианобактерий сходна с РЦ зеленых серных бактерий и *Heliobacterium*. Фд - ферредоксин; FNR - ферредоксин: NADPH-оксидоредуктаза; Z - акцептор электронов от системы расщепления воды (Mn-центр);  $b_{559}$  - цитохром  $b$  с максимумом поглощения при 559 нм.

Рисунок 18 - Фотосинтетический аппарат цианобактерий

### Лабораторная работа № 28 Схема фотосинтетического переноса электронов у Rhodospirillales и Chlorobiales. Аноксигенный фотосинтез

Цель работы - ознакомиться и изучить работу фотосинтетического аппарата анаэробных фототрофных бактерий.

Схема аноксигенного фотосинтеза анаэробных фототрофных бактерий представлена на рисунке 19.



По вертикали - окислительно-восстановительный потенциал. Цит - цитохром; Fd - ферредоксин; УХ - убихинон; P870 или P840-Бхл а [донор электронов реакционного центра (РЦ)]; X - акцептор электронов РЦ. Фотохимический реакционный центр заключен в рамку.

Рисунок 19 - Схема фотосинтеза у Rhodospirillales и Chlorobiales

## 6 Наследственность и изменчивость микроорганизмов

### 6.1 Спонтанный и индуцированный мутагенез

#### Основные вопросы темы:

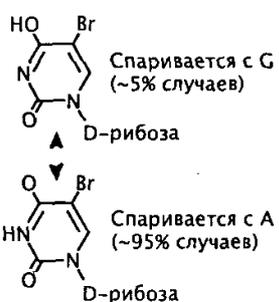
- 1) мутации их возникновение. Ненаправленный характер мутаций. Спонтанные, молчащие, обратные мутации и реверсии;
- 2) индуцированные мутации. Механизмы их образования;
- 3) репарация ДНК;
- 4) генетическая рекомбинация, ее особенности у микроорганизмов;
- 5) передача признаков у микроорганизмов путем прямого контакта – конъюгация. Особенности процесса;
- 6) конъюгация. F-фактор и его значение при конъюгации;
- 7) плазмиды. Факторы фертильности и резистентности;
- 8) передача признаков у микроорганизмов: трансдукция, трансформация.

#### Лабораторная работа № 29 Индуцированные мутации. Механизм их образования

Цель работы – изучить группы веществ, вызывающих мутацию прокариотических клеток.

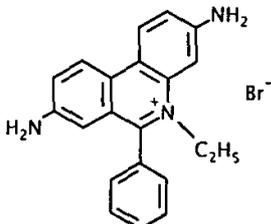
Частоту мутаций можно повысить, обрабатывая клетки мутагенными веществами. Мутагенами могут быть химические, физические или биологические агенты. В таблице 11 представлены основные группы мутагенов и механизм их действия.

Таблица 11

Мутаген	Механизм действия	Мутация
1	2	3
<b>Аналог основания</b> 5-бромурацил  <p>Спаривается с G (~5% случаев)</p> <p>Спаривается с A (~95% случаев)</p>	Включение вместо Т, случайное ошибочное спаривание с G	АТ → GC (~5%)
<b>Соединения, реагирующие с ДНК</b> Азотистая кислота (HNO <sub>2</sub> )	Окислительное дезаминирование А и С	АТ → GC GC → АТ

Гидроксиламин (NH <sub>2</sub> OH)	Превращение NH <sub>2</sub> в позиции 4 С в –NHOH или –NHO-CH <sub>3</sub>	GC → AT
<b>Алкилирующие агенты</b> Монофункциональные: этилметансульфонат $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ Бифункциональные N-нитро-N-нитрозогуанидин $\text{O}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(\text{NH})=\text{N}-\text{NO}_2$	Метилирование G, ошибочное спаривание с T  Алкилирование и сшивка цепей ДНК с удалением модифицированного участка ДНКазой; мутации в результате неправильного узнавания ферментом PolI	GC → AT  Точковые мутации и делеции

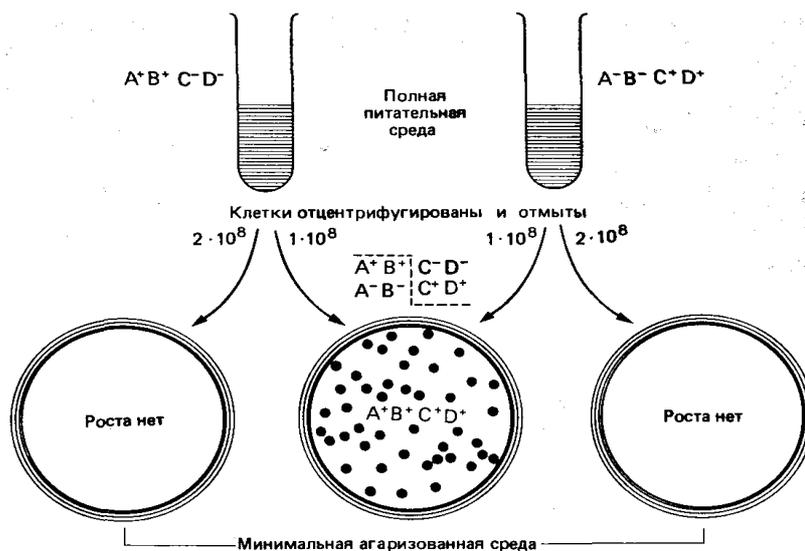
Продолжение таблицы 11

1	2	3
<b>Вставка</b> Полициклические ароматические соединения: Бромистый этидий 	Внедрение между двумя нуклеотидными парами	Вставка и делеция
<b>Облучение</b> УФ	Образование пиримидиновых димеров (с последующим вырезанием очень короткого фрагмента ДНК); мутации в результате неправильного узнавания ферментом PolI («непрямой мутагенез»)	Замена пары нуклеотидов или делеция

### Лабораторная работа № 30 Конъюгация у микроорганизмов

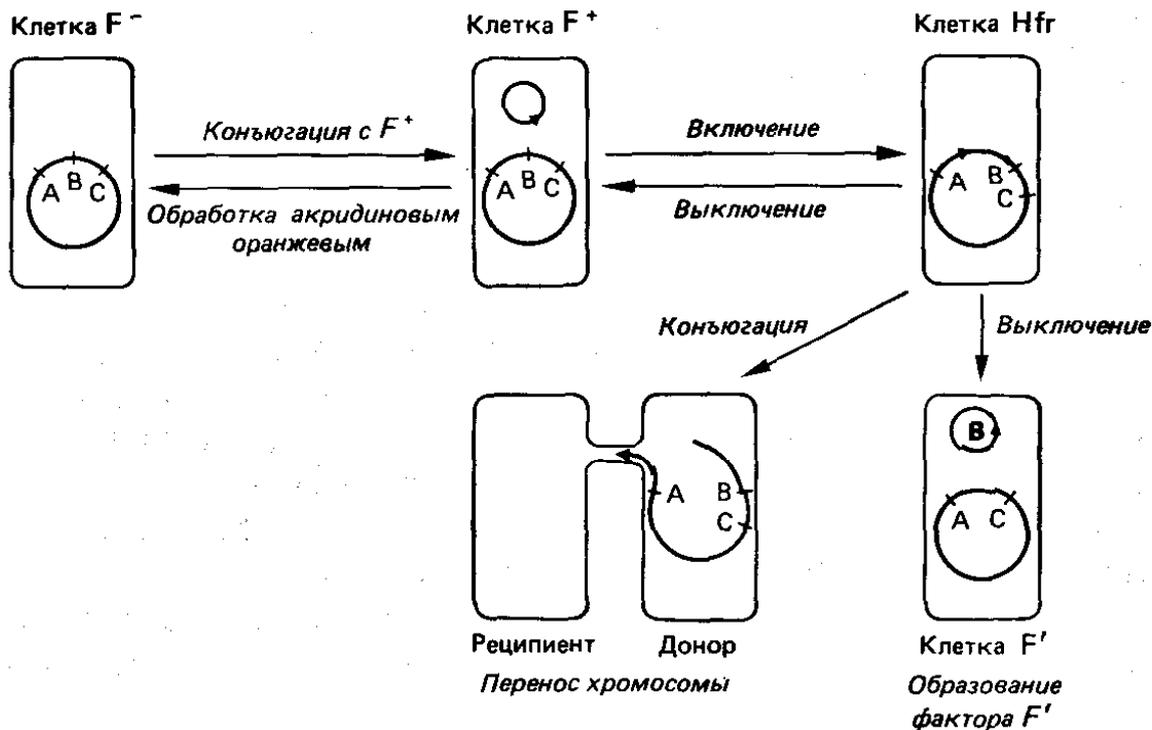
Цель работы – изучить процесс конъюгации.

Процесс прямого переноса генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками представлены на рисунках 20, 21.



1 – пробирка с ауксотрофным мутантом по аминокислотам С и D, 2- пробирка с ауксотрофным мутантом по аминокислотам А и В, 3 – чашка с прототрофной культурой бактерий.

Рисунок 20 - Рекомбинация при конъюгации двух мутантов Escherichia coli K12 с различными парами биохимических дефектов



Клетка  $F^-$  может служить только реципиентом. При конъюгации с клеткой штамма  $F^+$  или Hfr она может получить фактор F и в результате стать клеткой  $F^+$ . В клетке  $F^+$  фактор F представляет собой кольцевую молекулу ДНК. Этот фактор можно удалить путем обработки клеток акридиновым оранжевым. При включении фактора F в бактериальную хромосому клетка переходит в состояние Hfr. Фактор может включиться в разные участки хромосомы и в различной ориентации; от этого зависит, с какого места начнется, и в каком направлении будет происходить перенос

хромосомы (показано красными стрелками). В случае неправильного выключения фактора F из хромосомы он может превратиться в фактор F', содержащий кусочек хромосомной ДНК.

Рисунок 21 - Взаимоотношения между половыми типами *Escherichia coli*

### **Лабораторная работа № 31 Механизм репарации ошибок спаривания путем DAM-метилирования**

Цель работы – изучить механизм репарации ДНК длинными последовательностями.

Вверху рисунка 22 показана частично метилированная (CH<sub>3</sub>) двухцепочечная ДНК с ошибкой спаривания А—С. Белок MutS узнает ошибочный сайт и связывается с ним, после чего совместно с белками MutL и MutH при использовании энергии АТФ образует четвертичную структуру, включающую частично метилированные сайты. Фермент MutH производит разрезы в неметилированной цепи по обе стороны от ошибочной пары. При участии различных экзонуклеаз и ДНК-полимеразы III происходит сшивка концов (лигирование) и метилирование с образованием репарированной ДНК (репарация длинными последовательностями).

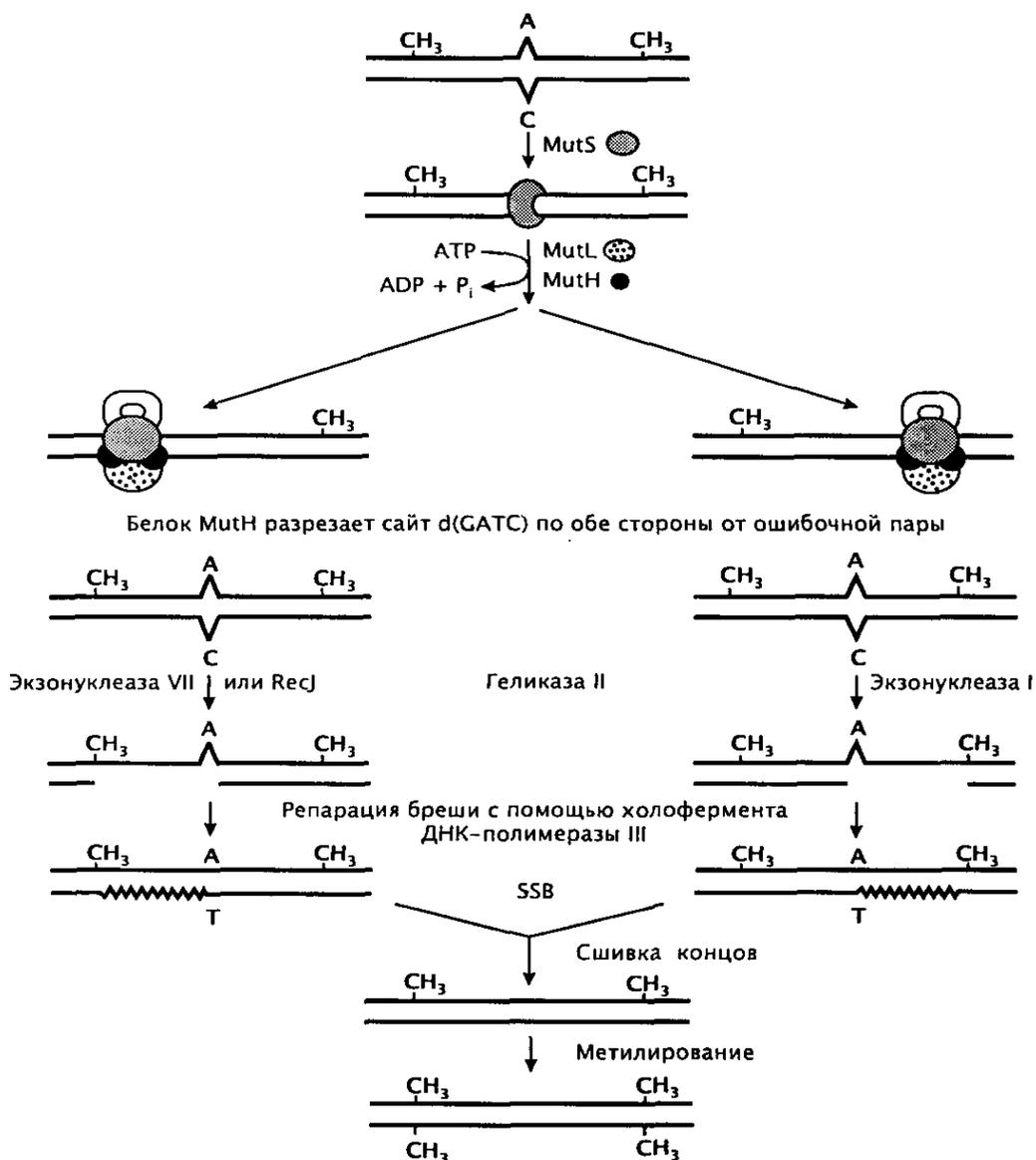


Рисунок 22 - Репарация ошибок спаривания путем DAM-метилирования

## Лабораторная работа № 32 Генетическая карта хромосомы *Escherichia coli*

Цель работы – ознакомиться с принципом прерванной конъюгации для создания генетических карт хромосом бактерий.

Используя метод прерванной конъюгации, позволяющий выяснить временную последовательность переноса генов из клетки-донора, можно составить карту расположения генов в бактериальной хромосоме (рисунок 23). Скорость их переноса в течение всего процесса остается постоянной. Перенос всей хромосомы *E. coli* продолжается при 37 °С около 100 мин. Моменты перехода внутрь клетки-реципиента позволяют судить о расстояниях между ними в хромосоме.

Последовательность расположения генов на бактериальной хромосоме определена также и для *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*.



## Лабораторная работа № 33 Оценка степени загрязненности поверхностных водоемов

Цель работы – изучить метод оценки степени загрязненности поверхностных водоемов.

Любой поверхностный водоем представляет собой сложную экологическую систему, формирующуюся под влиянием множества факторов, которые в конечном итоге определяют качество природной воды и возможность использования водоема в тех или иных целях. Качество воды в водоисточнике оценивается комплексом показателей санитарно-химического, бактериологического и гидробиологического анализов, дополняющих друг друга. Санитарно-химический анализ фиксирует общий уровень загрязнения и его характер; бактериологический - оценивает санитарно-эпидемиологическое состояние водоема и возможное присутствие в воде патогенных микроорганизмов; гидробиологический анализ не только оценивает степень загрязненности воды, но и помогает расшифровать сущность процессов, происходящих в водоеме при его загрязнении. Вследствие многообразия загрязнений, поступающих в водоем, биологические методы приобретают первостепенное значение в связи с тем, что химический контроль зависит от предварительных знаний о возможном поступлении в водоем того или иного вида загрязнений.

Сообщества гидробионтов - своеобразные информационные системы, отражающие различные изменения в водной среде, так как чутко реагируют на кумулятивное действие множества факторов, определяющих качество воды. Гидробиологический анализ основан на способности некоторых видов гидробионтов обитать в среде с той или иной степенью загрязненности. Это свойство организмов, обусловленное их физиологическими особенностями, называется *сапробностью* данного организма.

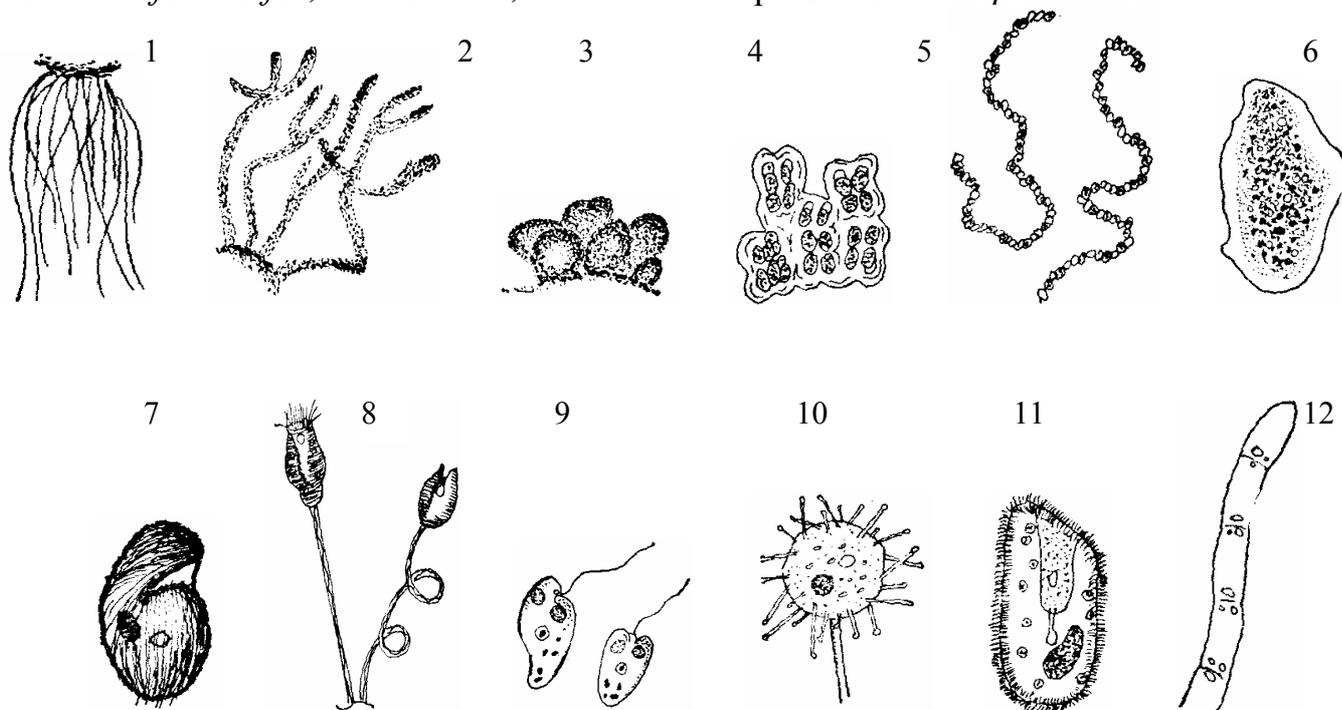
Далеко не все обитатели водной среды являются хорошими индикаторами, так как многие из них приспособлены к существованию, как в загрязненной, так и в достаточно чистой воде. Например, некоторые серобактерии встречаются и в воде, где разлагаются органические вещества с образованием сероводорода, и в чистых минеральных сернистых источниках.

Система сапробности, созданная Р. Кольквитцем и М. Марсоном (1908 - 1909), затем была дополнена и развита Я. Я. Никитинским и Г. И. Долговым, Р. Пантле, Г. Букком и др.

В зависимости от степени загрязненности водоемы или их зоны подразделяются на поли-, мезо-, олиго- и ксеносапробные.

**Полисапробная зона** - зона **сильного загрязнения** - характеризуется большим количеством легкоокисляющихся органических веществ и практически полным отсутствием кислорода. Фотосинтез отсутствует, а поверхностная аэрация не может обеспечить водоем кислородом, так как он мгновенно потребляется на процессы окисления в поверхностном слое. В силу этих причин в полисапробной зоне доминируют анаэробные процессы, осуществляемые гетеротрофными организмами. В воде присутствуют газообразные продукты анаэробного распада органических веществ — метан, сероводород, диоксид углерода. Число микроорганизмов может достигать многих миллионов в 1 мл. В условиях сильного загрязнения наблюда-

ется массовое развитие разнообразных сапрофитов, в том числе нитчатых бактерий вида *Sphaerotilus natans*, серных бактерий родов *Beggiatoa* и *Thiothrix*, бактерий вида *Zoogloea ramigera*. Среди животных организмов полисапробной зоны наиболее распространены простейшие: бесцветные жгутиковые, инфузории, некоторые амебы. Наиболее характерные сапробные организмы этой зоны показаны на рисунке 24. Микронаселение бентоса полисапробной зоны в основном составляют анаэробные сапрофитные бактерии, в том числе сульфатредуцирующие. В илах обитают олигохеты *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus*, личинки комара *Chironomus plumosus*.



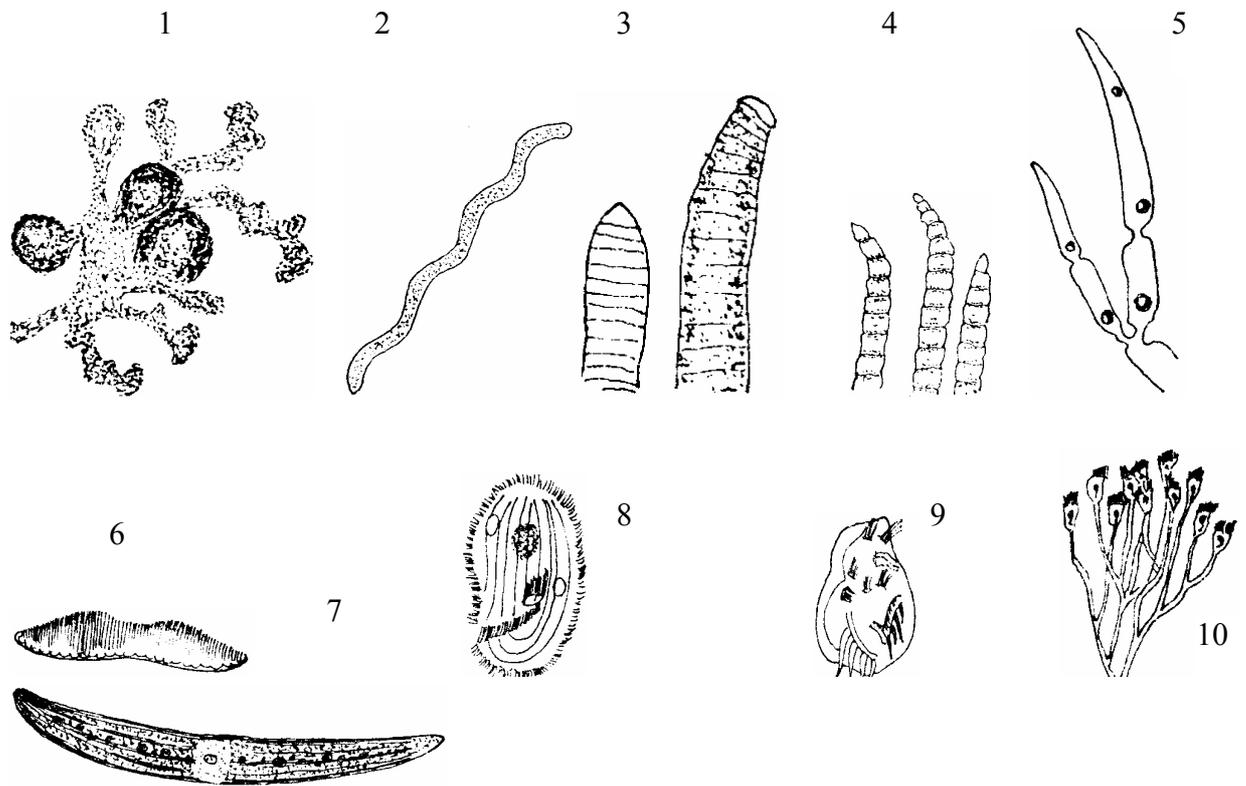
**Бактерии:** 1 - *Sphaerotilus natans*; 2 - *Zoogloea ramigera*; 3 - *Zoogloea uva*; 4 - *Sarcina paludosa*; 5 - *Streptococcus marginatum*.

**Простейшие:** 6 - *Pelomyxa palustris*; 7 - *Colpidium colpoda*; 8 - *Vorticella microstoma*; 9 - *Oicomonas mutabilis*; 10 - *Podophria fixa*; 11 - *Paramecium putrinum*.

**Цианобактерии:** 12 - *Oscillatoria putrida*.

Рисунок 24 - Некоторые индикаторные организмы полисапробной зоны

Зона **среднего загрязнения** подразделяется на  **$\alpha$ - и  $\beta$ -мезосапробные** подзоны. В водоемах, относящихся к  $\alpha$ -мезосапробным, концентрация органических веществ довольно высокая. Кислород имеется, но его недостаточно. Тем не менее, процессы окисления органических соединений носят аэробный характер и сопровождаются образованием аммиака. Обитатели этой зоны — организмы, выносливые к недостатку кислорода. Преобладают гетеротрофные бактерии, появляются грибы, цианобактерии. Животные организмы представлены многочисленными видами инфузорий, бесцветных и окрашенных жгутиковых, встречаются колероватки, низшие ракообразные — *Daphnia pulex*, *D. magna*. В илах много личинок хирономид. Некоторые индикаторные организмы этой зоны показаны на рисунке 25.



**Бактерии:** 1 - *Zoogloea filipendula*.

**Цианобактерии:** 2 - *Arthrospira major*; 3 - *Oscillatoria princeps*; 4 - *Oscillatoria Formosa*.

**Грибы:** 5 - *Leptomitum lacteus*.

**Водоросли:** 6 - *Hantzschia amphioxys*; 7 - *Closterium acerosum*.

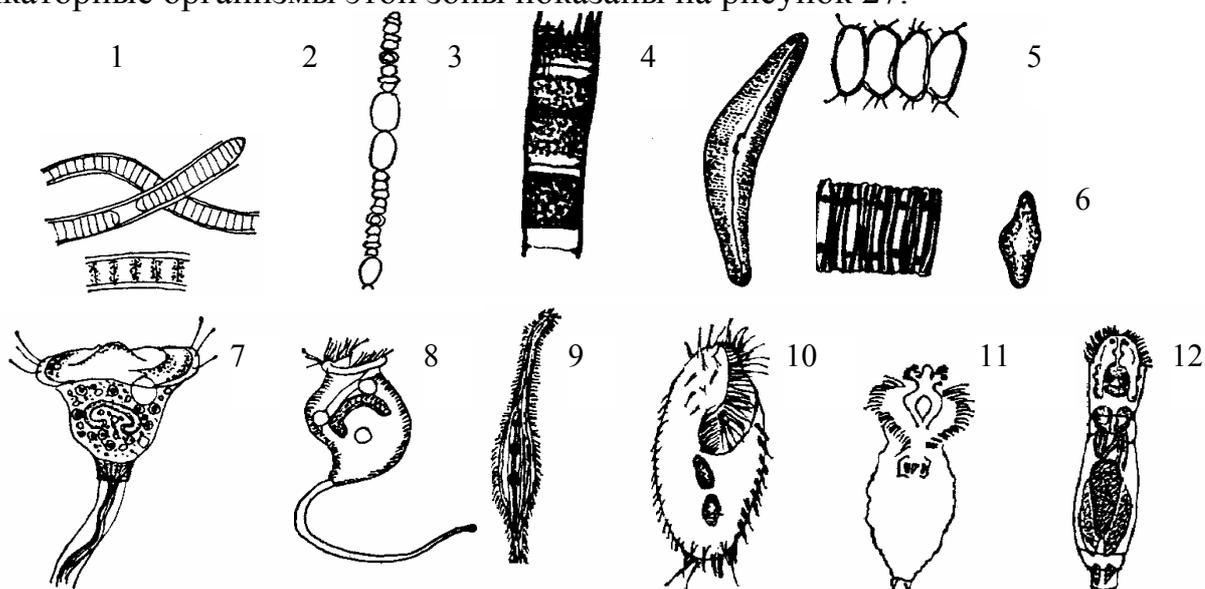
**Инфузории:** 8 - *Chilodonella uncinata*; 9 - *Aspidisca costata*; 10 - *Carchesium polyrium*.

Рисунок 25 - Некоторые индикаторные организмы  $\alpha$ - мезосапробной зоны

Для водоемов, относящихся к  $\beta$ -мезосапробной зоне, характерно почти полное отсутствие легкоокисляемых органических веществ. Вода содержит аммиак и продукты его окисления — нитриты и нитраты. В массе развиваются автотрофные организмы — многие виды водорослей, нитрифицирующие бактерии. Разнообразны животные планктона: инфузории, корненожки, коловратки, низшие ракообразные (рисунок 26). Количество сапрофитных бактерий по сравнению с полисапробными водоемами значительно меньше и составляет несколько тысяч в 1мл. Кислорода в воде достаточно. Более того, в результате фотосинтетической деятельности фитопланктона в дневные часы вода может быть пересыщена кислородом, но в темное время суток концентрация его резко снижается. В донных отложениях идет интенсивная минерализация с участием бактерий, многочисленных видов червей, личинок разнообразных насекомых, моллюсков. У берегов развиты макрофиты.

**Олигосапробная зона - зона чистой воды.** Растворенные органические вещества практически отсутствуют, в связи с чем, основная часть насекомых планктона составляет автотрофные организмы. В этих водоемах резких колебаний концентрации кислорода в течение суток не наблюдается. Количество кислорода близко к пол-

ному насыщению. Процессы нитрификации заканчиваются. Отмечается большое видовое разнообразие гидробионтов (диатомовые и зеленые водоросли, коловратки, ветвистоусые и веслоногие рачки). В илах обитают личинки поденок, моллюски. Индикаторные организмы этой зоны показаны на рисунок 27.



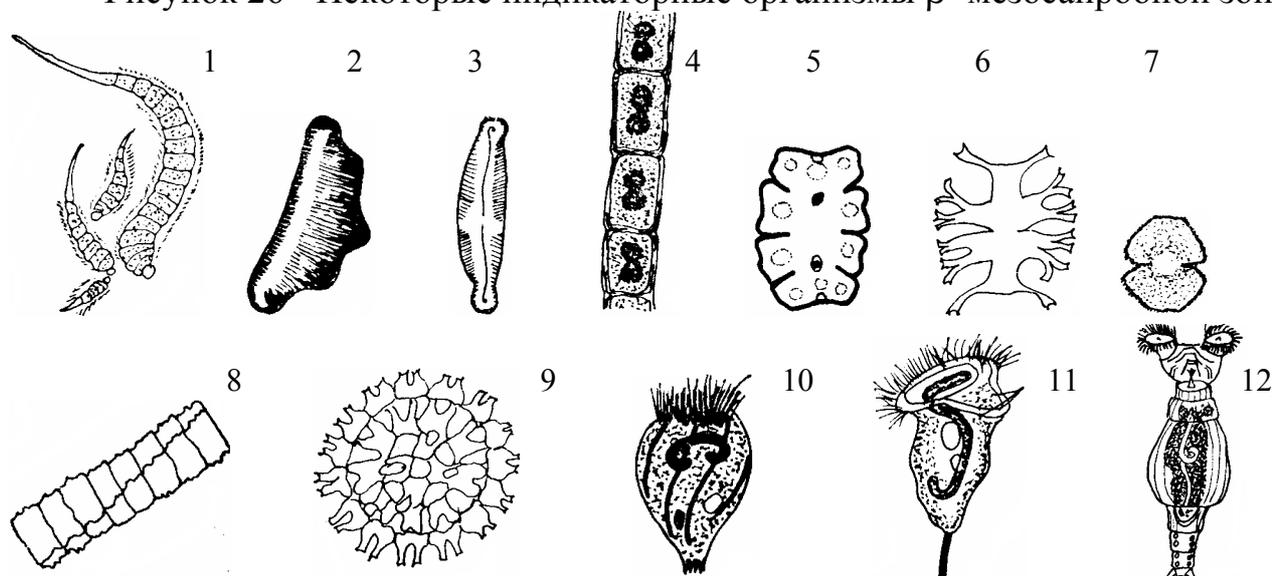
**Цианобактерии:** 1 - *Lyngbua martensiana*; 2 - *Anabaena solitaria*.

**Водоросли:** 3 - *Melosira granulata*; 4 - *Cymbella lanceolata*; 5 - *Scenedesmus denticulatus*; 6 - *Fragilaria construens*.

**Инфузории:** 7 - *Vorticella companula*; 8 - *Vorticella mayeri*; 9 - *Litonotus Cygnus*; 10 - *Stylonichia muscorum*.

**Коловратки:** 11 - *Rhinoglena frontalis*; 12 - *Tncentrum mustella*.

Рисунок 26 - Некоторые индикаторные организмы  $\beta$ - мезосапробной зоны



**Цианобактерии:** 1 - *Calothrix parietina*.

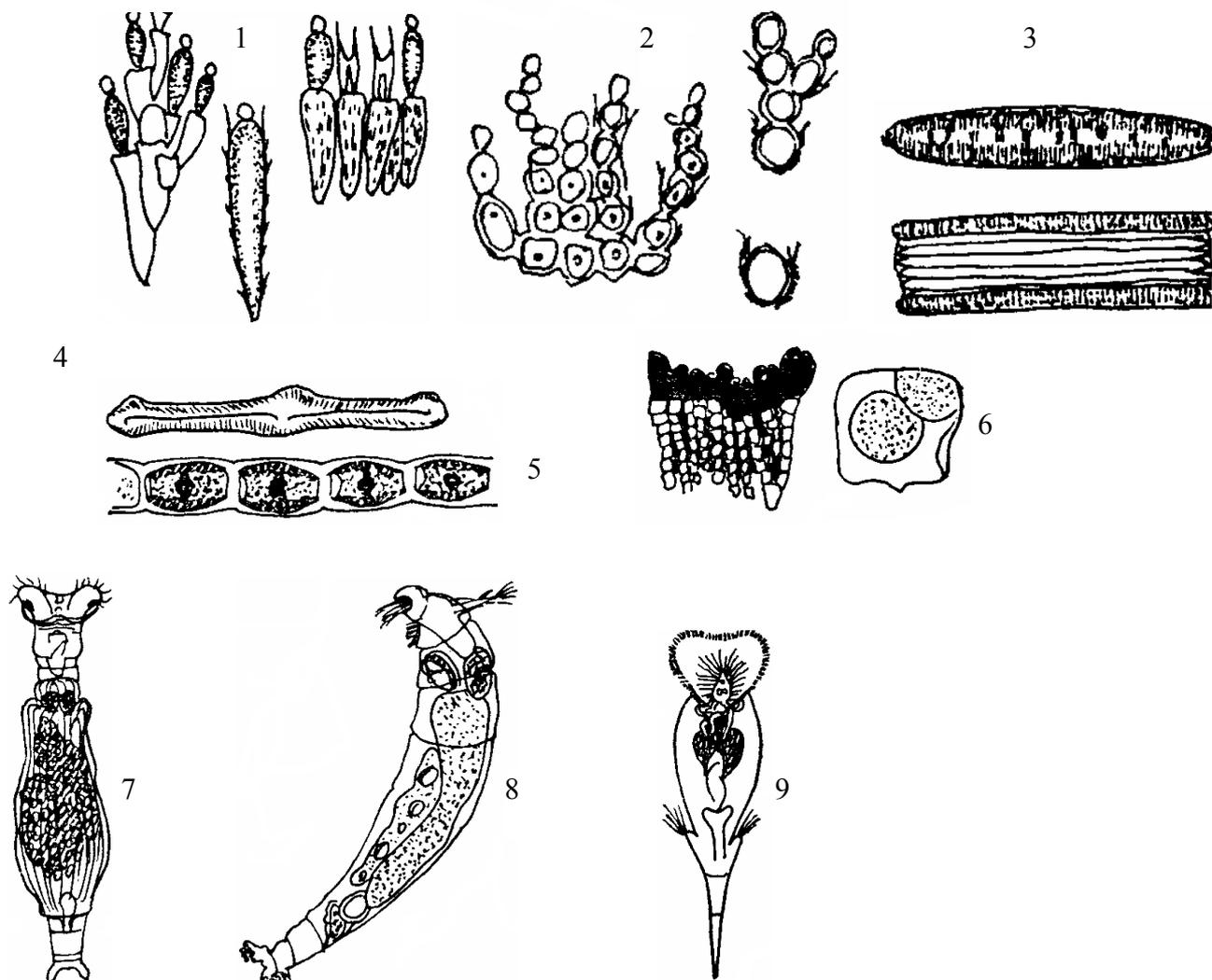
**Водоросли:** 2 - *Eunotia triodon*; 3 - *Pinnularia microstauron*; 4 - *Zygnema stellinum*; 5 - *Euastrum truncatum*; 6 - *Micrasterias radiate*; 7 - *Cosmarium turpini*; 8 - *Desmidium swartzii*; 9 - *Pediastrum biradiatum*.

**Инфузории:** 10 - *Strobilidium gyrans*; 11 - *Vorticella picta*.

**Коловратки:** 12 - *Philodina citrina*.

Рисунок 27 - Некоторые индикаторные организмы олигосапробной зоны

Ксеносапробность характеризует наиболее чистые водоемы, не несущие следов антропогенного воздействия. Эта степень сапробности по сути представляет собой лучшую часть олигосапробности. Типичные для нее организмы показаны на рисунке 28.



**Цианобактерии:** 1 - *Chamaesiphon fuscus*; 2 - *Chamaesiphon polonicus*.

**Водоросли:** 3 - *Diatoma hiemale*; 4 - *Pinnularia gibba*; 5 - *Microspora amoena*; 6 - *Lithoderma fontanum*.

**Коловратки:** 7 - *Otostephanos annulatus*; 8 - *Philodinavus paradoxus*; 9 - *Microcodon clavus*.

Рисунок 28 - Некоторые индикаторные организмы ксеносапробной зоны

Каждую зону сапробности (и соответствующие ей сапробные организмы) обозначают определенным индексом: полисапробность - *p*;  $\alpha$ -мезосапробность — *a*;  $\beta$ -мезосапробность - *b*; олигосапробность - *o*; ксеносапробность – *x*.

Существуют различные методы количественной оценки сапробности зон или участков водоемов. Например, по методу Пантле и Букка по результатам биологического анализа рассчитывают индекс сапробности воды *S*:

$$S = \frac{\Sigma(sh)}{\Sigma h},$$

где  $s$  — значение сапробности организмов (и соответствующих зон):

$p = 4, a = 3, b = 2, o = 1, x = 0;$

$h$  — относительная частота встречаемости видов.

Для оценки относительной частоты встречаемости видов применяют шести-ступенчатую шкалу (таблица 12).

Таблица 12 - Оценка относительной частоты встречаемости видов

Шкала частоты	Количество экземпляров одного вида в процентах от общего числа особей	Значение $h$
Очень редко	1	1
Редко	2 - 3	2
Нередко	4 - 10	3
Часто	10 - 20	5
Очень часто	20 - 40	7
Массовость	40 - 100	9

В специальных таблицах или атласах указана степень сапробности каждого индикаторного организма. Пример расчета индекса сапробности по результатам биологического анализа пробы воды показан в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты биологического анализа и расчет индекса сапробности воды

Виды, обнаруженные в пробе их сапробности	$s$	$h$	$Sh$
<i>Euglena viridis</i> (p)	4	1	4
<i>Closterium acerosum</i> (a)	3	1	3
<i>Cymbella ventricosa</i> (b)	2	5	10
<i>Diatoma vulgare</i> (b)	2	7	14
<i>Melosira italica</i> (b)	2	5	10
<i>Navicula viridula</i> (a)	3	2	6
<i>Colpoda cucullus</i> (a)	3	1	3
<i>Surirella ovata</i> (b)	2	5	10
Результаты расчета	—	$\Sigma = 27$	$\Sigma = 60$

Примечание. Величина  $S = 60:27 = 2,2$ .

Рассчитанный индекс сапробности показывает, что анализируемая вода по степени загрязненности является  $\beta$  - мезосапробной.

Таким образом, степень загрязненности водоема оценивается не по отдельным сапробным организмам, даже если они хорошие индикаторы, а по сообществам организмов, обнаруживаемых в водоеме. При этом анализируется только вода, но и донные отложения и обрастания.

Реакция биоценозов на загрязнение водоема приводит и появлению или исчезновению отдельных видов, имеющие индикаторное значение, к уменьшению числа видов, изменению относительного видового состава сообщества, а также соотношения между гетеротрофными и автотрофными организмами. Таким образом, биологические критерии оценки качества воды позволяют получить обобщенное, представление о ходе процесса самоочищения в водоеме.

Для оценки влияния на водоем сточных вод и хода процесса самоочищения в нескольких точках выше и ниже створа выпуска сточных вод водоем осматривают, отбирают и анализируют пробы воды и донных отложений. По результатам гидробиологического анализа проб планктона, бентоса, включая оброст, рассчитывают индекс сапробности для каждого участка, на котором отбирались пробы.

Результаты гидробиологического *анализа* рассматриваются в совокупности с данными санитарно-химического и бактериологического анализов. Окончательная количественная оценка процесса самоочищения и качества воды в водоеме дается на основе комплексного обследования водоема в разные сезоны года.

Некоторые обобщенные химические и бактериологические показатели для водоемов разной степени сапробности приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Химические и бактериологические показатели состояния водоемов

Степень Сапробности	Растворенный O <sub>2</sub> , мг/л	Окисляемость, мг/л	Микробное число	Прямой счет микроорганизмов	Титр E.coli, мл
Полисапробная	3 - 2	5 - 15	$n \cdot 10^5 - 10^6$	$10^7 - 10^8$	0,005 - 0,001
α- Мезосапробная	5 - 4	4	$n \cdot 10^4$	$10^7$	0,05 - 0,005
β- Мезосапробная	7 - 6	3	$n \cdot 10^3$	$10^7$	1 - 0,05
Олигосапробная	8	2	$n \cdot 10^2$	$10^6$	10 - 1
Ксеносапробная	9	1	$n \cdot 10$	$10^5$	100 - 10

Чтобы предотвратить загрязнение водоема, к спускаемым сточным водам предъявляются определенные требования. «Правилами охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами» нормируются показатели качества воды в ближайшем к месту выпуска створе реки, используемом в качестве источника водоснабжения или для культурно-бытовых целей. Этот створ называется расчетным. Нормативы качества воды назначают с учетом процессов смешения и самоочищения, происходящих на участке от выпуска сточных вод до расчетного створа.

В зависимости от вида водопользования участки водоемов делят на две категории.

К первой категории относятся водоемы или их участки, используемые для целей питьевого водоснабжения. Качество воды для водоемов первой категории должно удовлетворять следующим требованиям; БПК<sub>полн</sub> - не более 3 мг/л; растворенный кислород в пробе, отобранной до 12 ч дня, - не менее 4 мг/л; увеличение взвешен-

ных веществ в расчетном створе - не более 0,25 мг/л по сравнению с концентрацией взвеси в реке до спуска сточной воды.

Ко второй категории относят участки водоемов, используемые для купания и отдыха населения, а также водоемы в черте населенных пунктов. Для водоемов второй категории установлены следующие нормативы: БПК<sub>полн</sub> - не более 6 мг/л; растворенный кислород - не менее 4 мг/л, увеличение взвешенных веществ - не более 0,75 мг/л. Более высокие требования предъявляются к водоемам, используемым в рыбохозяйственных целях. БПК<sub>полн</sub> для таких водоемов не должна превышать 2 мг/л. Концентрация растворенного кислорода в зимний период не должна быть ниже 6 мг/л для водоемов, предназначенных для воспроизводства и сохранения ценных пород рыб, и не менее 4 мг/л для водоемов, используемых в других рыбохозяйственных целях. В летний период содержание кислорода в водоемах обоих видов должно быть не ниже 6 мг/л в пробе, отобранной до 12 ч дня. Сточные воды, спускаемые в водоемы всех видов водопользования, не должны содержать веществ, способных оказать неблагоприятное влияние на водные организмы или опасных для здоровья людей.

## 7.2 Санитарно-микробиологическое исследование воды

Открытые водоемы постоянно загрязняются органическими веществами и разнообразными микроорганизмами попадающими туда со сточными, ливневыми и талыми водами. Основным путем микробного загрязнения водоемов является попадание неочищенных городских отходов и сточных вод. Микрофлора сточных вод содержит обитателей кишечника человека и животных, включая представителей нормальной и условно-патогенной флоры. В ее состав могут входить и патогенные виды (возбудители кишечных инфекций, иерсиниозов, лептоспирозов, вирусы гепатита, полиомиелита и др.). Загрязнение водоемов происходит также при купании людей, скота, стирке белья. Хотя патогенные бактерии слабо приспособлены к существованию в воде, где на них оказывает неблагоприятное воздействие солнечный свет и различные другие факторы, включая конкурентную водную микрофлору, многие из них могут достаточно длительное время сохраняться в воде. Более того, в летнее время при наличии в воде органических веществ, щелочном рН и благоприятной температуре некоторые из них, например, холерный вибрион, могут даже размножаться. Заразиться можно и при использовании в пищу льда, в котором патогенные бактерии могут сохраняться в течение нескольких недель и даже месяцев.

По степени микробного загрязнения различают три категории воды, или зоны водоема:

1) полисапробная (*греч. sapros - гнилой*) зона - наиболее загрязненная вода, бедная кислородом и богатая органическими веществами. Количество бактерий в 1 мл воды достигает 1 млн. и более. Преобладают *E. coli* и анаэробные бактерии, вызывающие процессы аммонификации и брожения;

2) мезосапробная зона - умеренно загрязненная вода. В ней активно происходит минерализация органических веществ с интенсивными процессами окисления и нитрификации. Содержание микроорганизмов в 1 мл воды - сотни тысяч (в основном это нитрифицирующие облигатно аэробные бактерии, а также *Clostridium*,

*Pseudomonas, Mycobacterium, Flavobacterium, Streptomyces, Candida* и др.), количество *E. coli* значительно меньше,

3) олигосапробная зона - зона чистой воды. Характеризуется окончившимся процессом самоочищения, небольшим содержанием органических соединений. Количество микроорганизмов в 1 мл воды - от 10 до 1000. *E. coli* отсутствует или встречается в количестве нескольких клеток на 1 л воды.

Патогенные микроорганизмы, попадающие в водоемы, достаточно обильны в полисапробных зонах, постепенно отмирают в мезосапробных и практически не обнаруживаются в олигосапробных зонах.

Питьевая вода считается хорошей, если общее количество бактерий в 1 мл - не более 100; сомнительной - 100-150; загрязненной, если содержание бактерий в 1 мл - 500 и более. Количество микроорганизмов в придонном слое ила озер и рек варьирует в пределах от 100 до 400 млн на 1 г ила.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды и выявлению патогенных микроорганизмов (сальмонелл, холерных вибрионов, лептоспир, шигелл и энтеровирусов). Кроме того, поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные методы, позволяющие дать количественную оценку степени фекального загрязнения воды (выявление БГКП, *E. coli*, энтерококков, стафилококков). Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, сточные жидкости.

### **Лабораторная работа № 34 Оценка санитарно-бактериологического состояния воды**

Цель работы – оценить санитарно-бактериологическое состояние воды.

**Отбор проб воды.** Воду для санитарно-бактериологического исследования отбирают в количестве 500 мл в бутылки или флаконы с ватно-марлевой пробкой, предварительно простерилизованные в бумажных пакетах. К горлышку бутылки привязывают бумажный пакетик с завернутой в него запасной пробкой.

Пробы воды из открытых водоемов (колодцев, бассейнов, озер, рек и пр.) отбирают с помощью стерильных батометров. После наполнения бутылки водой с заданной глубины, ее извлекают из батометра и закрывают стерильной пробкой. Сверху надевают бумажный колпачок и маркируют пробу. Пробы воды из открытых водоемов рекомендуется брать на глубине 10-15 см от поверхности воды и на таком же расстоянии от дна при малой глубине водоема.

Из водопроводных кранов воду отбирают следующим образом. Кран протирают изнутри тампоном, смоченным в спирте, и обжигают, после чего 10-15 мин спускают воду. Затем отбирают приблизительно 400 мл воды. Заполненный флакон плотно закрывают стерильной резиновой или корковой пробкой, а сверху надевают бумажный колпачок и маркируют пробу. При проведении анализа хлорированной воды во флакон для отбора проб (емкость 500 мл) перед стерилизацией вносят деклоратор - 10 мг гипосульфита натрия.

Бактериологическое исследование отобранных проб воды должно производиться не позднее 2 ч с момента отбора. В случае невозможности соблюдения этих сроков допускается проведение анализа воды не позднее, чем через 6 ч при хранении пробы при температуре от 1 до 6 °С.

### Определение ОМЧ воды

С флаконов в пробой воды снимают бумажные колпачки, вынимают пробки, горлышки фламбируют, после чего воду тщательно перемешивают осторожным продуванием воздуха через стерильную пипетку с ватой. Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, отобранных с таким расчетом, чтобы число выросших на чашках колоний колебалось в пределах от 30 до 300 (таблица 15).

Таблица 15 - Рекомендуемые объемы воды для определения микробного числа

Тип исследуемой воды:	Рекомендуемый для посева объем исследуемой воды:
Водопроводная вода	1 мл
Чистая вода	1 и 0,1мл
Более загрязненная вода	0,01 и 0,001мл
Сильно загрязненные воды и сточные жидкости	0,0001 и 0,00001мл

Для посева 0,1мл и меньших объемов исследуемую воду разводят стерильной водой. Готовят последовательно десятикратные разведения, используя для каждого разведения отдельную стерильную пипетку. По 1 мл каждого разведения вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-50 °С МПА, который тщательно, круговыми движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение суток при 37 °С. Воду из открытых водоемов засевают параллельно на две серии чашек, одну из которых инкубируют при 37 °С в течение суток, а другую - 2 суток при 20 °С. Затем подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний (видимых невооруженным глазом и при увеличении в 2-5 раз) и вычисляют микробное число воды - количество микроорганизмов в 1 мл.

### Определение коли-титра и коли-индекса воды

Коли-титр - минимальное количество воды (в мл), в котором обнаруживаются БГКП. Коли-индекс - количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды (по международному стандарту - в 100 мл). Эти показатели определяют двухэтапным бродильным (титрационным) методом или методом мембранных фильтров.

Бродильный метод - основан на посеве определенных объемов анализируемой воды и подращивании при 37 °С в средах накопления с последующим высевом бактерий на плотную среду Эндо, дифференцировании выросших бактерий и определении наиболее вероятного числа бактерий группы кишечных палочек (БГКП) в 1 л воды по таблицам 16, 17.

При исследовании воды открытых водоемов, а также воды на этапах очистки и обеззараживания засевают 100,0; 10,0; 1,0 и 0,1 мл. Для исследования водопроводной воды засевают три объема по 100,0 мл, три объема по 10,0 мл и три объема по 1,0 мл.

Указанные объемы воды помещают во флаконы или пробирки со средой Кесслера, снабженные поплавками или комочками ваты, погруженными на дно сосуда. Посев 100,0 и 10,0 мл воды производят во флаконы и пробирки соответственно с 10,0 и 1,0 мл концентрированной среды; посев 1,0 и 0,1 мл воды в пробирки с 10,0 мл среды нормальной концентрации. Посевы инкубируют 24 часа при 37 °С. Отсутствие помутнения и образования кислоты и газа во флаконах и пробирках позволяет получить отрицательный результат и закончить исследование.

Таблица 16 - Определение коли-индекса при исследовании воды

Объем исследуемой воды, мл				Коли-индекс	Коли-титр
100	10	1,0	0,1		
-	-	-	-	Менее 9	Более 111
-	-	+	-	9	111
-	+	+	-	10	105
+	-	-	-	23	43
+	-	+	-	94	10
+	+	-	-	230	4
+	+	-	+	960	1
+	+	+	-	2380	0,4
+	+	+	+	Более 2380	Менее 0,4

Из каждого флакона или пробирки, в которых замечено помутнение, кислота, газ делают посев петлей на поверхность среды Эндо, разделенной на 3-4 сектора. Посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 16-18 часов. При отсутствии роста, а также при наличии колоний не характерных для бактерий группы кишечной палочки (пленчатых, губчатых, с неровными краями и поверхностью, плесневых и др.) считают результат отрицательным. Из выросших на среде Эндо красных, розовых, бледно-розовых колоний с металлическим блеском или без него (лактозоположительные колонии) делают мазки, окрашивают по Граму и ставят оксидазный тест, позволяющий дифференцировать БГКП от грамотрицательных бактерий семейства Pseudomonadaceae и других оксидазоположительных бактерий, обитающих в воде. С этой целью 2-3 изолированные колонии снимают с поверхности среды стеклянной палочкой, наносят штрихом на фильтрованную бумагу, смоченную раствором диметил-п-фенилендиамина. При отрицательном оксидазном тесте цвет бумаги не изменяется, при положительном она окрашивается в синий цвет в течение 1 мин.

Таблица 17 - Определение коли-индекса при исследовании 300 мл воды

Количество положительных результатов анализов воды			Коли-индекс
из трех флаконов по 100мл	из трех пробирок по 10мл	из трех пробирок по 1 мл	
0	0	0	Менее 3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	Более 1100

Наличие грамтрицательных палочек в мазках и отрицательный оксидазный тест позволяют немедленно дать положительный ответ о наличии БГКП при анализе воды на этапах очистки и воды открытых водоемов. При исследовании водопроводной воды грамтрицательные палочки, не образующие оксидазу, вновь исследуют в бродильном тесте, внося петлей посевной материал в полужидкий питательный агар с 0,5 % глюкозы, и инкубируют при 37 °С в течение суток. При наличии кислоты и газа результат считают положительным.

Результат анализа выражают в виде коли-индекса, величину которого определяют по таблицам 5 и 6. Зная коли-индекс, рассчитывают коли-титр по формуле

$$\text{коли-титр} = \frac{1000}{\text{коли-индекс}}$$

Метод мембранных фильтров. Сущность метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема анализируемой воды на мембранный фильтр, выращивании их при 37 °С на среде Эндо, дифференцировании выросших колоний и подсчета бактерий группы кишечных палочек в 1 л воды.

Воду из водопроводной сети и воду из артезианских скважин фильтруют в объеме 333 мл. Чистую воду открытого водоема фильтруют в объеме 100; 10; 1 и 0,1 мл, более загрязненную - 0,1; 0,01 и 0,001 мл. Для фильтрования воды используют мембранные фильтры №3 (диаметр пор 0,7 мкм), помещают их в стеклянный стакан с подогретой до 80 °С дистиллированной водой и ставят на слабый огонь до закипания. Кипячение фильтров производят трижды по 10 мин. После первого и второго кипячения воду сливают. После последнего кипячения воду не сливают и фильтры оставляют в ней до употребления.

Перед работой фильтровальный аппарат Зейтца протирают спиртом. Фильтр помещают в воронку фильтровального аппарата, который присоединен к вакуум-насосу. Начинают исследования с больших разведений. При посевах объемов 1 мл и меньше их разводят в 10 мл стерильной водопроводной воды, а затем фильтруют. После окончания фильтрации фильтры укладывают на поверхность среды Эндо в чашках Петри фильтрующей поверхностью вверх. На одну чашку можно помещать 3 - 4 фильтра. Чашки с фильтрами выдерживают 18-24 ч при 37 °С. Для подсчета выбирают фильтры с числом колоний не менее 10 и не более 50. Учету подлежат все красные или темно-красные колонии с металлическим блеском или без него. В дальнейшем схема подтверждения принадлежности выделенных бактерий к группе кишечной палочки аналогична описанной для бродильного метода.

### **7.3 Санитарно-микробиологический контроль воздуха специализированных и жилых помещений**

#### **Лабораторная работа № 35 Оценка санитарно-микробиологического состояния помещений**

Цель работы – оценить санитарно-микробиологическое состояние помещения.

Посев воздуха можно произвести двумя методами:

1) седиментационным (Коха), основанным на оседании под действием силы тяжести определенного количества бактерий на определенную площадь питательной среды при определенной температуре и за определенное время;

2) аспирационным методом, основанным на использовании специальных аппаратов (например, аппарата Кротова), для принудительной аспирации определенного объема воздуха над поверхностью чашки Петри с питательной средой (МПА), куда

и оседают бактерии. При учете роста подсчитывают число колоний на чашке (одна колония - потомство одной клетки).

Седиментационный метод не дает полного количественного представления о микрофлоре воздуха. Он почти не улавливает тонкодисперсные бактериальные и пылевые фракции. Однако, пользуясь этим методом, можно контролировать чистоту воздуха помещений. В зависимости от предполагаемой загрязненности воздуха микробами чашки со средой экспонируют 5 – 10 - 20 мин. Чем чище воздух, тем продолжительнее экспозиция. Если поставлена цель уловить определенную группу микробов, используют элективную агаровую среду и экспозицию увеличивают на 30 - 50 мин.

Чтобы обнаружить микроорганизмы, содержащиеся в воздухе данного помещения, производят посев на стерильную чашку Петри со стерильным застывшим МПА. Для этого чашку Петри открывают и ставят в исследуемом помещении в таком месте, в котором нет движения воздуха. Чашку оставляют открытой на 20 мин. Затем закрывают, переворачивают вверх дном, заворачивают в бумагу и ставят в термостат на 48 часов.

По числу выросших колоний можно судить об относительном количестве микробов, содержащихся в воздухе помещения в момент посева.

Если в среднем на одной чашке с питательным агаром выросло до 200 колоний, воздух считается чистым, свыше 200 колоний - загрязненным (таблица 18).

Таблица 18 - Оценка качества воздуха жилых помещений

Воздух	Содержание микробов в 1 м <sup>3</sup>	
	Летний режим	Зимний режим
Чистый	<4500	< 1500
Загрязненный	>7000	>2500

Аспирационный метод используют для отбора проб воздуха в следующих помещениях: оперблоках; перевязочных; послеоперационных палатах; отделениях и палатах реанимации и интенсивной терапии и других помещениях, требующих асептических условий.

Отбор проб воздуха производят при соблюдении следующих условий:

- 1) чистое подготовленное к работе помещение;
- 2) закрытые форточки и двери;
- 3) определение в помещении процента относительной влажности воздуха;
- 4) уровень высоты отбора проб воздуха соответствует высоте рабочего стола;
- 5) не ранее чем через 30 мин после влажной уборки помещения.

Пробы воздуха отбирают с помощью приборов для бактериологического анализа воздуха (прибора Кротова), скорость протягивания воздуха должна составлять 25 л/мин, объем пропущенного воздуха - 100 л/мин для определения общего количества бактерий, 250 л/мин для определения золотистого стафилококка.

Исследование воздуха седиментационным методом допускается в исключительных случаях. В протоколе количество плесневых грибов указывают отдельно.

При переносе аппарата Кротова из одного помещения в другое его поверхность обрабатывают дезинфицирующим раствором. Столик, внутренние стыки и крышку прибора с внутренней и внешней стороны протирают 70° спиртом.

Критерии оценки микробной обсемененности воздуха в хирургических клиниках - операционные до начала работы - не выше 500 колоний/м<sup>3</sup>, во время работы - не выше 1000 колоний/м<sup>3</sup>; и в том, и в другом случае в 250 л воздуха патогенного стафилококка не должно быть.

Для определения общего содержания бактерий в 1 м<sup>3</sup> отбор производят на 2 %-ный питательный агар, разлитый в чашки по 12 - 15 мл. Для определения золотистого стафилококка используют желточно-солевой агар, для определения плесневых и дрожжевых грибов - среду Сабуро.

При выявлении в воздухе санитарно-показательных микроорганизмов - стрептококков и стафилококков - определяют их гемолитическую (по зонам гемолиза на кровяном агаре) и плазмокоагулирующую (по свертыванию цитратной кроличьей плазмы) активности.

## 7.4 Санитарно-микробиологическое исследование почвы

Обычно, попавшие в почву представители нормальной микрофлоры человека и животных, а также патогенные микроорганизмы, длительно не выживают. Однако, многие представители нормальной микрофлоры человека, способны включаться в состав биоценоза почвы, а отдельные виды остаются постоянными обитателями. На сроки выживания патогенных бактерий в почве влияют состав и тип почвы, температура, влажность, атмосферные осадки, степень загрязненности, а также ее характер (органическое, микробное или химическое загрязнение). Патогенные микроорганизмы, обнаруживаемые в почве, разделяют на три группы:

1) патогенные микроорганизмы, постоянно обитающие в почве (например, *Clostridium botulinum*, возбудители подкожных микозов, виды *Actinomyces*, некоторые возбудители микотоксикозов);

2) спорообразующие патогенные микроорганизмы (*Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, виды *Clostridium*, вызывающие анаэробные инфекции). Бактерии попадают в почву с выделениями человека и животных, а также с трупами погибших животных. При благоприятных условиях они могут размножаться и сохраняться в виде спор длительное время.

3) патогенные микроорганизмы, попадающие в почву с выделениями человека и животных, и сохраняющиеся сравнительно недолго (в течение нескольких недель или месяцев). Это различные неспоровые бактерии (виды *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Brucella*, *Francisella*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, *Pseudomonas*, энтеровирусы, вирус ящура).

Оценку санитарного состояния почв проводят с учетом комплекса показателей: подсчитывают общее количество сапрофитных микроорганизмов и определяют наличие санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП, *Clostridium perfringens* и др.). Высокая численность сапрофитной микрофлоры свидетельствует об ор-

ганическом загрязнении, при микробной контаминации преобладают санитарно-показательные микроорганизмы. При необходимости также исследуют состав нитрифицирующих и аммонифицирующих бактерий, актиномицетов, грибов, целлюлозолитических микроорганизмов и др.

### **Лабораторная работа № 36 Оценка состояния почвы по результатам определения общего микробного числа, коли-титра, перфрингенс-титра и количества термофильных бактерий**

Цель работы – оценить санитарно-микробиологическое состояние почвы

#### **Отбор проб и определение микробного числа**

На обследуемой территории до 1000 м выделяют два участка по 25 м. Один должен быть расположен вблизи источников загрязнения (выгребные ямы, мусорные ящики и пр.), а другой - в отдалении от них. На каждом участке намечают 5 точек - четыре по углам, и одну в центре участка. Таким образом, отбирают 10 проб (из разных мест исследуемой территории). Почву берут стерильным ножом на глубине 10-15 см, образцы массой 200-300 г помещают в стерильную банку или пакет и хорошо перемешивают. Смешанный образец с каждого из двух выбранных участков должен иметь массу не менее 1 кг.

Из проб готовят навеску (30 г), которую вносят в колбу со стерильной водой (270 мл) и тщательно встряхивают в течение 10 минут. Из полученной суспензии готовят разведения  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ . По 1 мл из двух последних разведений вносят в две стерильные чашки Петри, после чего их заливают 10-15 мл расплавленного и остуженного до 45-50 °С МПА, который тщательно, круговыми движениями перемешивают. Среде дают застыть на строго горизонтальной поверхности. Посевы выращивают в течение суток при 37 °С. Затем подсчитывают число выросших колоний и определяют микробное число.

#### **Определение коли-титра, перфрингенс-титра и количества термофильных бактерий**

Для определения коли-титра различные разведения почвенной суспензии засевают по 1 мл в пробирки с 5 мл среды Кесслера или КОДА и инкубируют при 43 °С в течение 24 - 48 часов. В дальнейшем анализ проводят по схеме, применяемой для определения коли-титра воды. Для посева используют различные разведения (чистую почву засевают от 1 г до разведения  $10^{-3}$ , загрязненную - от  $10^{-3}$  до  $10^{-6}$ ). При анализе загрязненных почв можно провести прямой поверхностный посев почвенной суспензии в количестве 0,1 - 0,5 мл на среду Эндо (используют разведения до  $10^{-6}$ ).

Для определения перфрингенс-титра также используют разведения почвенной взвеси (чистую почву засевают в разведении  $10^{-1}$  -  $10^{-3}$ , загрязненную - от  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$ ). По 1 мл из выбранных разведений засевают в пробирки с 5 мл стерильного обезжиренного молока или с железосульфитной средой Вильсона-Блера. Посевы инкубируют при 43 °С в течение 24 - 48 часов, после чего учитывают результаты по

характерному свертыванию молока или по образованию черных колоний *S. perfringens* в агаровом столбике среды Вильсона-Блера. Из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют и вычисляют перфрингенс-титр. Предельное разведение почвенной суспензии, при посеве из которого на молочной среде наблюдается размножение *S. perfringens*, означает титр этого микроорганизма в почве.

Для определения количества термофильных бактерий разведения полученной суспензии ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  и  $10^{-3}$ ) по 1 мл вносят в чашки Петри, заливают их расплавленным и остуженным МПА, тщательно перемешивают. Посевы инкубируют при 60 °С в течение суток, а затем подсчитывают количество выросших колоний и пересчитывают на 1 г почвы.

Санитарно-микробиологическую оценку почвы проводят по комплексу показателей, из которых наиболее важным является степень фекального загрязнения (таблица 19). Оценка санитарного состояния почвы по основным микробиологическим показателям.

Таблица 19

Характеристика почвы	Коли-титр	Перфрингенс-титр	Количество термофильных бактерий в 1 г почвы
Чистая	1,0 и выше	0,01 и выше	$10^2$ - $10^3$
Загрязненная	0,9-0,01	0,009-0,0001	от $10^3$ до $10^5$
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,00009 и ниже	от $10^5$ до $4 \cdot 10^6$

## Список использованных источников

- 1 Шлегель, Г. Общая микробиология/ Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. - 567с.
- 2 Емцев, В.Т. Микробиология/ В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. - М.: Дрофа, 2005. – 445с.
- 3 **Определитель бактерий Берджи**: в 2 т. / пер. с англ. под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С.Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 800с.
- 4 **Романенко, В.И.** Экология микроорганизмов пресноводных водоемов/ В.И. Романенко, С.И. Кузнецов. - Л., 1978. – 265с.
- 5 **Методы изучения водных микроорганизмов**/ С.И. Кузнецов, Г.А. Дубинина. - М.: Наука, 1989 – 305с.
- 6 **Звягинцев, Д.Г.** Почва и микроорганизмы/ Д.Г. Звягинцев. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. - 397с.
- 7 **Звягинцев, Д.Г.** Методы почвенной микробиологии и биохимии/ Д.Г. Звягинцев. - М.: Изд-во МГУ, 1991. - 304с.
- 8 **Теппер, Е.З.** Практикум по микробиологии/ Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. - М.: Агропромиздат, 1987. – 247с.
- 9 **Практикум по микробиологии**/ под ред. Н.С.Егорова. - М.: Изд-во Моск.ун-та, 1976. – 185с.
- 10 **Герхард, Ф.** Методы общей бактериологии: в 3 т./ Ф. Герхард. - М.: Мир, 1983.

## Приложение А

(справочное)

### Вопросы к зачету по курсу микробиологии

#### І.

- 1 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад отечественных ученых М.М. Тереховского, Д.С. Самойловича, И.И. Мечникова, Д.И. Ивановского, С.Н. Виноградского, З.В. Ермольевой в развитие микробиологии и вирусологии.
- 2 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, П. Эрлиха, А. Флеминга в развитие микробиологии.
- 3 Основные отличительные признаки прокариотических и эукариотических клеток. Формы бактериальных клеток, их особенности.
- 4 Различные методы микроскопирования микробиологических объектов (люминисцентная, фазово-контрастная, темнопольная, иммерсионная и электронная микроскопии).
- 5 Клеточная стенка микроорганизмов, действие на нее лизоцима и пенициллина. Техника и механизм окрашивания микроорганизмов по Граму. L- трансформация бактерий.
- 6 Особенности строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- 7 Цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток, строение, ее функции. Особенности строения цитоплазматической мембраны у археобактерий.
- 8 Капсулы, чехлы, слизи и межклеточный матрикс бактериальных клеток, структура и функции. Ворсинки, строение, функции.
- 9 Жгутики их расположение, функции и тонкое строение. Подвижность микроорганизмов - таксисы.
- 10 Генетический, белоксинтезирующий аппараты прокариотической клетки.
- 11 Структурная организация метаболического аппарата прокариот. Запасные вещества и другие внутрицитоплазматические включения.
- 12 Процесс спорообразования у микроорганизмов: экзо- и эндоспоры, свойства зрелых спор, продолжительность их жизни. Прорастание спор. Другие покоящиеся формы микроорганизмов.
- 13 Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану его значение в жизнедеятельности клетки. Виды транспорта их особенности.
- 14 Основные принципы систематики и классификации бактерий.
- 15 Питание микроорганизмов. Потребность и источники химических элементов. Питательные среды (универсальные, дифференциально-диагностические, селективные, специальные, синтетические) и условия роста.
- 16 Типы питания. Методы культивирования. Чистые и смешанные культуры, способы их получения.

- 17 Физиология роста бактерий. Рост и деление бактерий, виды деления бактерий. Клеточные циклы бактерий.
- 18 Физиология роста. Рост бактерий в периодической культуре. Характеристика кривой роста. Рост бактерий в непрерывной культуре. Синхронизация клеточного деления.
- 19 Методы определения числа бактерий. Прямые и косвенные методы определения бактериальной массы.
- 20 Подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов.
- 21 Виды и эффективность различных методов стерилизации (влажный и сухой жар, фильтрация, облучение, химические средства).
- 22 Методы консервирования, применяемые для защиты пищевых продуктов от микроорганизмов.
- 23 Метаболизм микроорганизмов. Ферменты, строение, классификация, свойства.

## **Приложение Б** **(справочное)**

### **Экзаменационные вопросы по курсу микробиологии**

- 1 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад отечественных ученых М.М. Тереховского, Д.С. Самойловича, И.И. Мечникова, Д.И. Ивановского, С.Н. Виноградского, З.В. Ермольевой в развитие микробиологии и вирусологии.
- 2 Предмет, задачи и основные этапы становления микробиологии как науки. Вклад А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, П. Эрлиха, А. Флеминга в развитие микробиологии.
- 3 Основные отличительные признаки прокариотических и эукариотических клеток. Формы бактериальных клеток, их особенности.
- 4 Различные методы микроскопирования микробиологических объектов (люминисцентная, фазово-контрастная, темнопольная, иммерсионная и электронная микроскопии).
- 5 Клеточная стенка микроорганизмов, действие на нее лизоцима и пенициллина. Техника и механизм окрашивания микроорганизмов по Граму. L- трансформация бактерий.
- 6 Особенности строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий.
- 7 Цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток, строение, ее функции. Особенности строения цитоплазматической мембраны у археобактерий.
- 8 Капсулы, чехлы, слизи и межклеточный матрикс бактериальных клеток, структура и функции. Ворсинки, строение, функции.
- 9 Жгутики их расположение, функции и тонкое строение. Подвижность микроорганизмов - таксисы.
- 10 Генетический, белоксинтезирующий аппараты прокариотической клетки.
- 11 Структурная организация метаболического аппарата прокариот. Запасные вещества и другие внутрицитоплазматические включения.
- 12 Процесс спорообразования у микроорганизмов: экзо- и эндоспоры, свойства зрелых спор, продолжительность их жизни. Прорастание спор. Другие покоящиеся формы микроорганизмов.
- 13 Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану его значение в жизнедеятельности клетки. Виды транспорта их особенности.
- 14 Основные принципы систематики и классификации бактерий.
- 15 Питание микроорганизмов. Потребность и источники химических элементов. Питательные среды (универсальные, дифференциально-диагностические, селективные, специальные, синтетические) и условия роста.
- 16 Типы питания. Методы культивирования. Чистые и смешанные культуры, способы их получения.

- 17 Физиология роста бактерий. Рост и деление бактерий, виды деления бактерий. Клеточные циклы бактерий.
- 18 Физиология роста. Рост бактерий в периодической культуре. Характеристика кривой роста. Рост бактерий в непрерывной культуре. Синхронизация клеточного деления.
- 19 Методы определения числа бактерий. Прямые и косвенные методы определения бактериальной массы.
- 20 Подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов.
- 21 Виды и эффективность различных методов стерилизации (влажный и сухой жар, фильтрация, облучение, химические средства).
- 22 Методы консервирования, применяемые для защиты пищевых продуктов от микроорганизмов.
- 23 Метаболизм микроорганизмов. Основные понятия. Ферменты, строение, классификация.
- 24 Метаболизм микроорганизмов. Основные понятия. Регуляция метаболизма. Конститутивные, катаболические и анаболические ферменты. Уровни регуляции клеточного метаболизма.
- 25 Биосинтез основных структурных веществ прокариотической клетки.
- 26 Физиология микроорганизмов. Путь Эмбдена - Мейергофа – Парнаса, схема Варбурга-Диккенса-Хореккера, путь Энтнера-Дудорова.
- 27 Физиология микроорганизмов. Спиртовое и молочнокислое брожения.
- 28 Физиология микроорганизмов. Пропионовокислое брожение. Брожение, вызываемое клостридиями и энтеробактериями.
- 29 Физиология микроорганизмов. Аэробное и анаэробное дыхание микроорганизмов.
- 30 Пурпурные и зеленые бактерии. Систематика, особенности морфологии, строения клеток, метаболизма. Распространение фототрофных бактерий.
- 31 Образование и значение антибиотиков для образующих их организмов. Методы выявления и количественного действия антибиотиков.
- 32 Особенности фотосинтеза аэробных оксигенных фототрофных бактерий.
- 33 Особенности аноксигенного фотосинтеза пурпурных и зеленых бактерий.
- 34 Фиксация молекулярного азота симбиотическими микроорганизмами. Условия формирования азотфиксирующей ассоциации. Биохимия азотфиксации.
- 35 Фиксация молекулярного азота свободноживущими азотфиксаторами.
- 36 Фиксация молекулярного азота ассоциативными азотфиксаторами.
- 37 Разложение целлюлозы, гемицеллюлозы.
- 38 Разложение хитина, крахмала и других  $\alpha$ -глюканов микроорганизмами.
- 39 Разложение легнина, белков и нуклеиновых кислот микроорганизмами.
- 40 Микробиологические процессы по разложению природных веществ протекающие в рубце жвачных животных.

- 41 Мутации их возникновение. Ненаправленный характер мутаций. Спонтанные, молчащие, обратные мутации и реверсии. Индуцированные мутации (включение аналогов и химическое изменение оснований, алкилирующие агенты, включение или утрата пар оснований, действие ультрафиолетового и ионизирующего излучений).
- 42 Репарация ДНК: фотореактивация, темновая реактивация, репарация длинными и короткими последовательностями.
- 43 Проявление и запаздывание проявления признаков. Накопление мутантных клеток микроорганизмов с новыми признаками. Основные принципы генетической рекомбинации.
- 44 Передача признаков у микроорганизмов путем прямого контакта – конъюгация. Особенности процесса. Фактор F,R. Плазмиды и бактериоцины.
- 45 Передача признаков у микроорганизмов: трансдукция, трансформация.
- 46 Экология микроорганизмов, их экологические ниши, местообитания, особенности микронаселения водных экосистем. Микробиологическая очистка сточных вод.
- 47 Патогенные микроорганизмы и инфекции, передающиеся через воду. Принципы санитарно-микробиологической оценки качества воды.
- 48 Микробиологическая оценка степени загрязнения поверхностных водоемов.
- 49 Проблема самоочищения водоемов, его возможности и микроорганизмы принимающие участие в нем.
- 50 Микроорганизмы как симбиотические партнеры животных и растений.