

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

А.О. ПЛОТНИКОВ

ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ

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

Оренбург 2007

УДК 579.8(076.5)

ББК 28.4я7

П 39

Рецензент

кандидат биологических наук А.Н. Сизенцов

П 39 **Плотников А.О.**
Частная микробиология и систематика микроорганизмов:
методические указания к лабораторному практикуму /
А.О. Плотников. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2007. – 72 с.

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных занятий по дисциплине специализации «Практическая идентификация и дифференциация микроорганизмов» в 5 семестре по специальности 020209 – Микробиология.

ББК 28.4я7

©Плотников А.О., 2007

© ГОУ ОГУ, 2007

Содержание

Введение.....	8
1 Методы выделения чистых культур и культивирования микроорганизмов	9
1.1 Питательные среды, их изготовление, стерилизация и применение с целью культивирования и дифференциации микроорганизмов	9
1.1.1 Приготовление твердой питательной среды.....	13
1.1.2 Предстерилизационная подготовка микробиологической посуды.....	14
1.1.3 Изготовление ватно-марлевых пробок.....	14
1.1.4 Устройство автоклава.....	15
1.1.5 Особенности роста бактерий на среде Эндо.....	15
1.2 Методы выделения чистых культур микроорганизмов.....	16
1.2.1 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью шпателя Дригальского.....	17
1.2.2 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью бактериологической петли.....	18
1.2.3 Выделение чистой культуры микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий из отдельной колонии методом глубинного посева	19
1.2.4 Пересев чистой культуры аэробных, микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий.....	19
1.3 Оценка чистоты выделенной культуры микроорганизмов.....	22
1.3.1 Оценка чистоты выделенной культуры.....	24
2 Методы идентификации чистых культур микроорганизмов.....	24
2.1 Методы оценки морфологических свойств микроорганизмов.....	24
2.1.1 Изготовление нативных препаратов (содержащих живые клетки) микроорганизмов.....	24
2.1.2 Изготовление препаратов фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов	26
2.2 Методы оценки культуральных свойств микроорганизмов.....	29
2.2.1 Оценка роста микроорганизмов на твердой среде и описание колоний	29
2.2.2 Оценка роста микроорганизмов на жидкой среде	29
2.3 Методы оценки физиолого-биохимических свойств микроорганизмов.....	31
2.3.1 Экспресс-оценка физиолого-биохимических свойств чистой культуры микроорганизмов.....	31
2.3.1.1 Оценка типа клеточной стенки бактерий методом «тяжа».....	31
2.3.1.2 Оценка каталазной активности бактериальной культуры.....	32
2.3.1.3 Оценка оксидазной активности бактериальной культуры.....	32
2.3.2 Классические методы исследования биохимической активности микроорганизмов.....	33
2.3.2.1 Оценка способности бактериальной культуры к анаэробному росту.....	33
2.3.2.2 Оценка окислительного и ферментативного метаболизма глюкозы исследуемой культурой бактерий (тест Хью-Лейфсона, О/Ф тест).....	34
2.3.2.3 Оценка сахаролитической активности бактериальной культуры.....	34
2.3.2.4 Оценка продукции ацетона исследуемой культурой бактерий (реакция Фогес-Проскауэра).....	35
2.3.2.5 Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу крахмала.....	36
2.3.2.6 Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу мочевины.....	36
2.3.2.7 Оценка способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу желатина	37
2.3.2.8 Оценка способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу казеина..	38
2.3.2.9 Оценка способности бактериальной культуры к продукции побочных газообразных продуктов расщепления пептонов.....	38
2.3.2.10 Оценка способности бактериальной культуры к продукции сероводорода..	39
2.3.2.11 Оценка способности бактериальной культуры к продукции индола.....	39

2.3.2.12	Оценка способности бактериальной культуры к редукции нитратов.....	40
2.3.2.13	Оценка способности бактериальной культуры к использованию цитрата натрия.....	41
2.3.2.14	Оценка способности бактериальной культуры к редукции метиленового синего.....	41
2.3.2.15	Оценка способности бактериальной культуры к продукции лизин-, орнитиндекарбоксилаз и аргининдегидролазы.....	42
2.3.2.16	Оценка способности бактериальной культуры к продукции фенилаланиндезаминазы.....	42
2.3.3	Методы исследования факторов патогенности, учитываемых при идентификации некоторых таксонов микроорганизмов.....	43
2.3.3.1	Оценка гемолитической активности бактериальной культуры.....	43
2.3.3.2	Оценка лецитиназной активности бактериальной культуры.....	43
2.3.3.3	Оценка способности бактериальной культуры к продукции плазмокоагулазы и фибринолизина.....	44
2.3.3.4	Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу ДНК или РНК....	44
3	Методы выделения, идентификации и дифференциации бактерий сем. Enterobacteriaceae.	45
3.1	Культуральные свойства энтеробактерий	45
3.2	Морфо-физиологические характеристики энтеробактерий, общие для семейства.....	49
3.3	Физиолого-биохимические характеристики отдельных родов энтеробактерий.....	53
3.4	Идентификация представителей сем. Enterobacteriaceae до уровня вида.....	58
4	Методы выделения, идентификации и дифференциации неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (НГОБ).....	63
4.1	Физиолого-биохимические характеристики отдельных родов НГОБ.....	63
4.2	Биохимические характеристики отдельных видов НГОБ.....	69
5	Литература, рекомендуемая для изучения темы.....	70
	Список использованных источников.....	71
	Приложение А.....	72
	Вопросы к экзамену по дисциплине «Частная микробиология и систематика микроорганизмов».....	72

Введение

Дисциплина «Частная микробиология и систематика микроорганизмов» изучается студентами специальности 020209 – Микробиология в 5-м семестре как дисциплина специализации (Федеральный компонент ДС.Ф.02).

Дисциплина изучается в соответствии с учебным планом специальности 020209 с учетом ГОС ВПО (раздел 4 «Общие требования к обязательному минимуму содержания основной образовательной программы по специальности (ранее 012400) - Микробиология»), введенным в действие с 10.03.2000 г. Министерством образования Российской Федерации.

Основной целью преподавания дисциплины является изучение особенности морфологии и цитологии, физиологии, биохимии и экологии ряда групп прокариотных и эукариотных микроорганизмов, систематики бактерий и вирусов.

Основу курса составляет изучение принципов и методов классификации и систематики микроорганизмов; принципов современной таксономии и филогении микроорганизмов; свойств, используемых при описании видов и надвидовых таксонов бактерий; критериев используемых для идентификации микроорганизмов; основных филогенетических групп прокариот и их морфологических, биохимических и генетических особенностей.

Будущий специалист-микробиолог должен получить современные представления о правилах описания и таксономии микроорганизмов, а также навыки выделения чистых культур бактерий и их идентификации.

1 Методы выделения чистых культур и культивирования микроорганизмов

1.1 Питательные среды, их изготовление, стерилизация и применение с целью культивирования и дифференциации микроорганизмов

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

Потребности микроорганизмов в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма. Во-первых, питательная среда должна включать доступный для клетки источник энергии. Для одних организмов (фототрофов) таким источником служит свет, для других - органический (хемоорганотрофы) или неорганический (хемолитотрофы) субстрат. Во-вторых, среда должна содержать все необходимые компоненты для реализации конструктивных процессов в клетке, причем синтетические способности микроорганизмов могут варьировать от использования CO_2 в качестве единственного источника углерода (автотрофы) до потребности в более восстановленных соединениях углерода - кислотах, спиртах, углеводах и др. (гетеротрофы). Последние чаще всего получают и углерод, и энергию, метаболизируя одно и то же органическое соединение, т.е., строго говоря, являются хемоорганогетеротрофами.

По составу среды для культивирования микроорганизмов делят на натуральные (естественные) и синтетические. К натуральным относятся среды, состоящие из продуктов животного или растительного происхождения: овощные или фруктовые соки, молоко, животные ткани, разведенная кровь, вода морей, озер, минеральных источников, а также отвары или экстракты, полученные из природных субстратов - мяса, рыбы, дрожжей, растений, круп, навоза и почвы. К натуральным относятся также и так называемые полусинтетические среды, состоящие из природных продуктов в комбинации с рядом определенных химических соединений. Натуральные среды богаты органическими веществами, однако имеют сложный и непостоянный состав, поэтому они малоприспособлены для исследования обмена веществ микроорганизмов. Синтетические среды представляют собой комплекс определенных химически чистых соединений, взятых в точно указанных концентрациях. Синтетические среды наиболее удобны для изучения метаболизма микроорганизмов. Состав синтетических сред может варьировать настолько широко, насколько широко изменяются пищевые потребности культивируемых на них микроорганизмов. В зависимости от задачи исследования синтетические среды готовят на водопроводной или дистиллированной воде. Синтетические среды могут иметь довольно большой набор компонентов (включая микроэлементы), но могут быть и относительно простыми по составу.

По назначению среды подразделяют на универсальные, элективные и дифференциально-диагностические (индикаторные). **Универсальные среды** предназначены для выделения и культивирования бактерий с одним типом метаболизма (например, мясо-пептонный агар или мясо-пептонный бульон для органогетеротрофных микроорганизмов).

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. Элективные среды применяют главным образом на первом этапе выделения микроорганизмов из естественных субстратов, т.е. для получения накопительных культур (например, среда Эшби является элективной для рода *Azotobacter*).

Дифференциально-диагностические среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Примером индикаторной среды для выявления бактерий из группы кишечной палочки в естественных субстратах может служить агаризованная среда Эндо. Бактерии рода *Escherichia* на этой среде образуют малиновые колонии с металлическим блеском. При определении видовой принадлежности бактерий часто используют рН-индикаторные среды в состав которых входит один из индикаторов – нейтральный красный (0,0005 %), феноловый красный (0,005 %) или бромтимоловый синий (0,0005 %). Если развитие микроорганизма сопровождается образованием кислоты или щелочи, цвет индикатора меняется. Индикаторные среды особенно часто применяются в санитарной и медицинской микробиологии.

По физическому состоянию среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми (плотными) и сыпучими. Жидкие среды широко применяют для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах. Полужидкие среды получают добавлением к жидким средам 0,5 % агара и используют для специальных целей, например культивирования анаэробных микроорганизмов. Сыпучие (сухие) питательные среды приобретают все большее практическое значение. Стандартность, простота хранения, транспортировки и изготовления делают их весьма удобными для работы. В микробиологическом производстве используются разваренное пшено, отруби. В клинической микробиологии нашли применение дифференциально-диагностические среды - среда Эндо, сухая желчь, среда Леффлера и т.д. Они представляют собой светло-желтые гигроскопичные порошки без комков с влажностью до 10 %. В сухом месте в хорошо закупоренной посуде их можно хранить длительное время. Они хорошо растворяются в воде при комнатной температуре в концентрации 1,5 - 6,0 %. Плотные среды используют в микробиологической практике со времен Р. Коха. Они необходимы для выделения чистых культур микроорганизмов, в диагностических целях, для количественного учета микроорганизмов, хранения культур и в ряде других случаев. Уплотняющими агентами являются агар, желатин, силикагель.

Агар-агар используют для уплотнения особенно часто. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин.

Кроме того, агар включает небольшое количество легкоассимилируемых веществ и различные соли. Агар получают из некоторых морских водорослей и выпускают в виде стебельков, пластин или порошка. Агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при 100 °С и затвердевает при температуре около 45 °С, поэтому на агаризованных средах можно культивировать значительную часть известных микроорганизмов. Чаще всего агар добавляют к средам в количестве 2 %, реже - 1,5 (более влажная среда) или 3 % (более сухая среда).

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает «обеспложивание». В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развитие посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение. Можно говорить только либо о стерильности, либо о нестерильности, но не может быть состояния «частичной или неполной стерильности», «близкого к стерильному», «почти стерильного».

Различают термическую и холодную стерилизацию. В микробиологии находят применение следующие способы термической стерилизации: прокалывание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. Из методов холодной стерилизации микробиологи используют стерилизацию фильтрованием, газообразными средствами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

Автоклавирование - стерилизация насыщенным паром под давлением.

Данный способ стерилизации питательных сред является наиболее надежным и чаще всего применяемым. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Известно, что температура пара возрастает при повышении его давления (таблица 1).

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает особую эффективность этого процесса. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121 °С. Лишь споры некоторых почвенных бактерий погибают при 1 ати только через 30 мин.

Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах — автоклавах. Автоклавы разнообразны по форме, размерам, рабочему давлению, конструкции и другим показателям. Они могут быть с ручным управлением,

полуавтоматические и автоматические, но, поскольку все автоклавы предназначены для выполнения одной и той же задачи - стерилизации, основной принцип их устройства один и тот же.

Таблица 1 - Температура насыщенного пара при разных давлениях

Давление			Температура, °С
атм	ати*	кПа	
1,0	0,0	101,32	100
1,5	0,5	151,98	111
2,0	1,0	202,65	121
2,5	1,5	251,20	128
3,0	2,0	299,75	134
ати* - избыточное атмосферное давление			

Автоклав представляет собой металлический двустенный резервуар, способный выдержать высокое давление. Его внутренняя часть является стерилизационной камерой. В нее помещают стерилизуемый материал. Стерилизационная камера снабжена краном для выхода воздуха, манометром для определения давления пара и предохранительным клапаном для выхода пара при повышении давления сверх необходимого и для предотвращения разрыва автоклава. Пространство между стенками, называемое водопаровой камерой, заполняется через воронку водой (лучше дистиллированной, чтобы не образовывалась накипь) до определенного уровня, который отмечен на специальной водомерной трубке автоклава. Выше этого уровня воду наливать не следует, так как при бурном кипении вода может попасть в трубку, ведущую к манометру и исказить его показания. В верхней части внутренней стенки водопаровой камеры имеются отверстия, через которые пар поступает в стерилизационную камеру. Паровой котел сверху покрыт защитным кожухом. Он предохраняет котел от механических повреждений, а работающего около автоклава - от ожогов. Для создания герметичности автоклав плотно закрывают массивной крышкой с резиновой прокладкой. Стерилизуемые предметы помещают на специальную подставку.

Основной способ стерилизации стеклянной посуды - **обработка сухим горячим воздухом** при температуре не выше 180 °С в течение 1 - 3 ч (таблица 2). При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Стерилизацию осуществляют в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации. Они различаются по форме и способам обогрева, но имеют сходное устройство. Их делают из термостойких материалов - обычно из металла и асбеста. Внутри стерилизатора имеются полки для размещения посуды, а наверху - отверстие, в котором с помощью пробки укрепляют термометр. У стенки стерилизатора

(шкафа) или вблизи греющей поверхности температура всегда значительно выше, чем внутри, поэтому ртутный шарик термометра должен находиться внутри шкафа на расстоянии от 6 до 8 см от верхней стенки. В верхней части сушильных шкафов имеется также отверстие для вентиляции, которое при стерилизации закрывают. Стерилизаторы и шкафы с электрическим обогревом снабжены терморегулятором, обеспечивающим автоматическое поддержание необходимой температуры.

Таблица 2 - Условия стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

Температура, °С	Время, мин
140	180
150	150
160	120
170	60

Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в стерилизатор (или сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный надежный прогрев стерилизуемого материала. Стерилизатор (сушильный шкаф) во время работы должен быть плотно закрыт. При отсутствии терморегулятора необходимо строго следить за температурой, так как при ее понижении не осуществится стерилизация, а при нагреве выше 180 °С бумага и пробки начинают обугливаться. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80 °С, поскольку при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться. Лучше всего выгружать посуду, когда температура в стерилизаторе сравняется с комнатной.

1.1.1 Приготовление твердой питательной среды

Цель работы – освоить практический навык приготовления твердой питательной среды (мясо-пептонного агара).

Методика выполнения работы.

Приготовьте навеску 2 г агар-агара и всыпьте ее в колбу со 100 мл мясо-пептонного бульона, нагрейте до растворения на водяной бане. Для просветления среды к расплавленному и остуженному до 50 °С мясо-пептонному агару добавьте взбитый яичный белок из расчета на 1 л среды. Мясо-пептонный агар кипятите в течение 30 мин, затем горячую среду фильтруйте через ватно-марлевый фильтр. Горячую среду разлить в колбы или флаконы не более чем до 1/3 объема, закрыть ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками.

1.1.2 Предстерилизационная подготовка микробиологической посуды

Цель работы – освоить практический навык предстерилизационной подготовки микробиологической посуды (чашки Петри, пипетки, стеклянные шпатели).

Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Посуду развертывают непосредственно перед употреблением. В верхние концы пипеток вставляют ватные тампоны. Торчащие из пипеток волокна ваты сжигают в пламени горелки. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4 - 5 см. Обмотку начинают с оттянутого конца и постепенным движением бумаги по спирали заканчивают у конца с ватным тампоном. Завернутые пипетки для предохранения бумаги от загрязнения и разрывов перед стерилизацией упаковывают по несколько штук вместе или помещают в специальные металлические или картонные пеналы. Чашки Петри обычно заворачивают в пакеты по 2 - 4 штуки, шпатели - по отдельности, но затем, как и пипетки, их объединяют в общий сверток. Колбы, пробирки и трубки Бурри закрывают ватными пробками. На пробки можно надеть бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли.

Методика выполнения работы.

Возьмите предложенную лабораторную посуду – пипетки, стеклянные шпатели и чашки Петри и заверните ее в бумагу в соответствии с указаниями преподавателя. Завернутые пипетки и шпатели для предохранения бумаги от загрязнения и разрывов упакуйте и завяжите по несколько штук вместе.

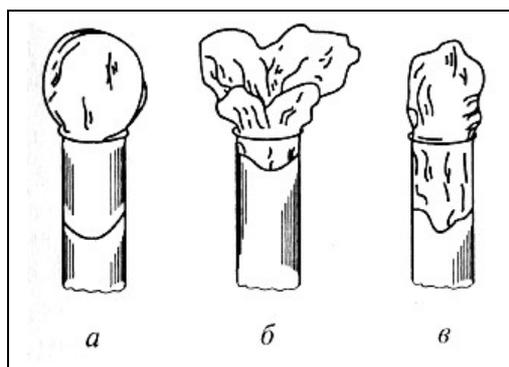
1.1.3 Изготовление ватно-марлевых пробок

Цель работы – освоить практический навык изготовления ватно-марлевых пробок для микробиологических пробирок.

Пробки изготавливают из ваты и марли и применяют для закрытия пробирок, колб и флаконов, предназначенных для культивирования микробов. Пробки предохраняют культуры от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе и от высыхания. Через пробки идет и газовый обмен культуры с окружающей средой. Поэтому пробки как фильтры должны быть достаточно плотными с равномерным распределением волокон ваты (рисунок 1). Для приготовления пробки следует взять простую, плохо смачивающуюся вату, так как пробки из гигроскопической ваты легче намокают и таким образом становятся хорошей средой для обитания микробов.

Методика выполнения работы.

Возьмите плоский кусок ваты, загните края и скатайте ее валиком. Для придания пробке прочности ее надо прокатать между ладонями, а лучше между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Длина пробки для пробирки должна быть около 4 см и входить в нее на 1,5 – 2,0 см. Для придания прочности пробку необходимо обернуть двуслойной марлевой салфеткой.



а – пробка, изготовленная правильно; б, в – пробки, негодные к применению.

Рисунок 1 – Ватные пробки

1.1.4 Устройство автоклава

Цель работы – ознакомиться с устройством автоклава.

Методика выполнения работы.

Изучите устройство автоклава и зарисуйте схему его строения в таблице 3, подпишите обозначения.

Таблица 3

Схема автоклава	Обозначения

1.1.5 Особенности роста бактерий на среде Эндо

Цель работы – изучить особенности роста бактерий на элективной среде Эндо с дифференциально-диагностическими свойствами.

Агар Эндо - слабоселективная дифференциально-диагностическая среда для выделения энтеробактерий. 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 (Na_2SO_3). Кроме того, 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 лактозо-положительные бактерии вырастают в виде ярко-розовых и красных колоний, часто с металлическим зеленоватым блеском. Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, бесцветны или слабо-окрашены.

Методика выполнения работы.

Изучите колонии лактозо-положительных и лактозо-отрицательных бактерий на среде Эндо, зарисуйте чашку Петри и сделайте обозначения колоний разных типов.

1.2 Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Физиологию, биохимические свойства и циклы развития микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистыми культурами. *Чистой, или аксенической*, называют культуру, содержащую микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры — необходимые условия работы с микроорганизмами. Выделение чистой культуры обычно включает три этапа:

- 1) получение накопительной культуры;
- 2) выделение чистой культуры;
- 3) определение чистоты выделенной культуры.

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

При создании селективных условий необходимо знать физиологию или четко представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Селективные условия создают чаще всего подбором соответствующих сред, поскольку различные микроорганизмы для своего развития предъявляют неодинаковые требования к источникам питания. Например, микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот, могут расти в среде, из состава которой исключены связанные формы азота. Если внести в такую среду почву, то из громадного разнообразия имеющихся в ней микроорганизмов в первую очередь будут развиваться азотфиксаторы.

Накопительные культуры автотрофных микроорганизмов получают на средах, где единственным источником углерода служит углекислота. Отсутствие в среде других соединений углерода задерживает развитие гетеротрофов. Такие специфические питательные среды, удовлетворяющие потребности преимущественно одной группы микроорганизмов, носят название селективных. В зарубежной литературе большее распространение получили термины «накопительные», или «селективные», среды.

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

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

Выделение чистой культуры из отдельной колонии.

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

При выделении чистой культуры ***аэробных*** микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной среды. Изолированные колонии ***микроаэрофильных*** микроорганизмов и ***факультативных анаэробов*** чаще получают методом глубинного посева.

1.2.1 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью шпателя Дригальского

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью шпателя Дригальского.

Методика выполнения работы.

Порядок работы следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную и охлажденную до 50 °С питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. После того как среда застынет, на ее поверхность из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю по поверхности плотной среды в

чашке Петри. Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих – рост изолированных колоний (рисунок 2).

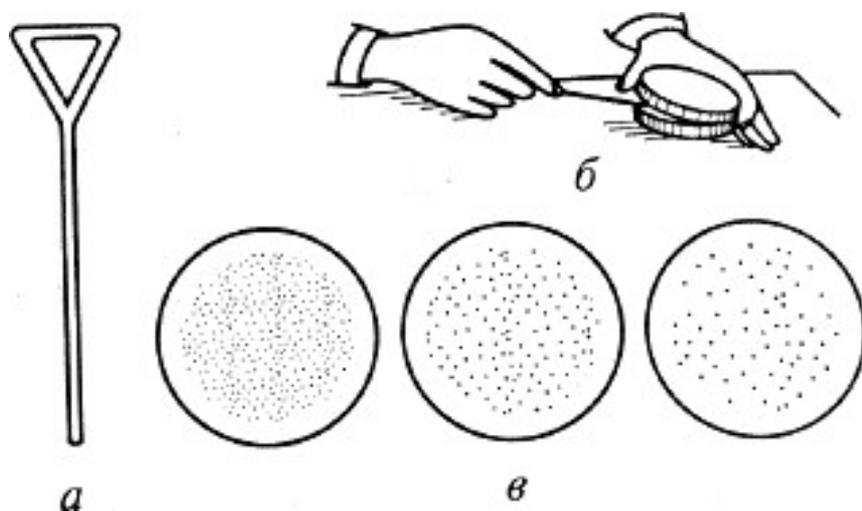
1.2.2 Выделение чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью бактериологической петли

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры аэробных бактерий из отдельной колонии с помощью бактериологической петли.

Рассевать накопительную культуру можно бактериологической петлей методом истощающего штриха.

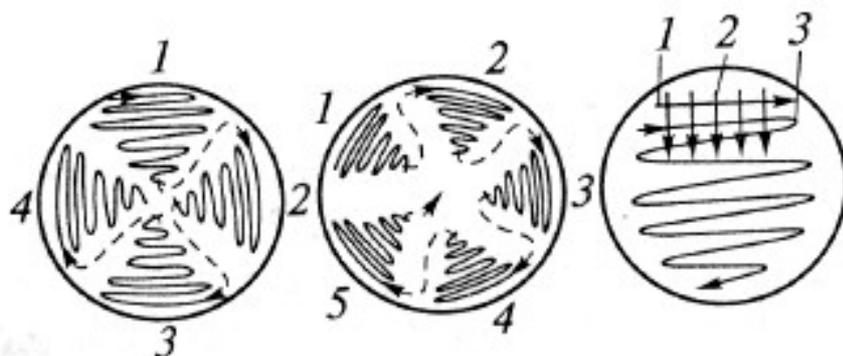
Методика выполнения работы.

Накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в порядке, указанном на рисунке 3. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1 – 7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов.



а — шпатель Дригальского; б — рассев; в — рост микроорганизмов после посева.

Рисунок 2 - Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем Дригальского



1 – 5 – последовательность посева культуры петлей.

Рисунок 3 - Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды бактериологической петлей

1.2.3 Выделение чистой культуры микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий из отдельной колонии методом глубинного посева

Цель работы – освоить практический навык выделения чистой культуры микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий из отдельной колонии методом глубинного посева.

Методика выполнения работы.

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

1.2.4 Пересев чистой культуры аэробных, микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий

Цель работы – освоить навык пересева чистой культуры аэробных, микроаэрофильных и факультативно анаэробных бактерий.

Методика выполнения работы.

Выросшие изолированные колонии отсейте петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду.

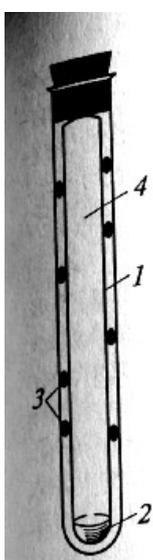
Особые трудности возникают при выделении чистых культур **облигатных анаэробов**. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу гибели клеток, то посев проводят на поверхность среды в чашки Петри, но после посева чашки тотчас помещают в анаэроостат. Однако чаще пользуются **методом разведения**.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

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

В некоторых случаях плотную среду из пробирки извлекают иначе. Пробирку слегка нагревают, все время быстро вращая ее над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика легко выскользывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии, захватывая их стерильными капиллярными трубками или петлей. Можно также вырезать их стерильным ланцетом. Извлеченные колонии переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Если изолированные колонии получены в капилляре, то после тщательной дезинфекции поверхности его разламывают стерильным пинцетом и участки капилляра, содержащие изолированные колонии, переносят в стерильную среду.

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

Метод вращающихся пробирок. Когда хотят получить изолированные колонии облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Р. Хангейта. Сущность его заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку стерильного инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой



1 - агаризованная питательная среда; 2 - конденсационная вода; 3 - колонии бактерий; 4 - смесь газов H_2 и CO_2 .

Рисунок 4 – Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Р. Хангейту)

пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Тонкий слой агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рисунок 4).

Применяют также модификацию метода Р. Хангейта. При этом расплавленную агаризованную среду при постоянном токе стерильного инертного газа разливают по пробиркам. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. После того как среда на стенках пробирки застынет, производят засев среды в этой пробирке в токе стерильного газа с помощью бактериальной петли, проводя штрих во вращающейся пробирке в направлении от ее дна к горлышку (рисунок 5).

Иногда для получения чистой культуры бывает достаточно одного посева в плотную среду, однако чаще посев в плотную питательную среду повторяют 2 - 3 раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

Выделение чистой культуры из одной клетки.

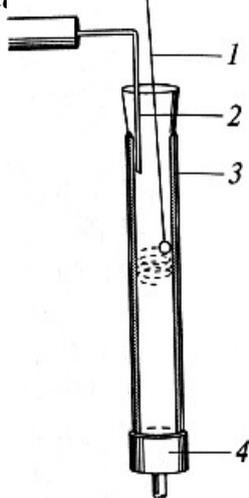
Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом с помощью микроманипулятора, а также с помощью микроселектора.

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

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора.

Микроманипулятор - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать из суспензии одну клетку. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива, между которыми расположен обычный микроскоп (рисунок 6). На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее



1 - бактериальная петля; 2 - трубка для подачи стерильного инертного газа; 3 - питательная среда, застывшая на стенках пробирки; 4 - механизм, вращающий пробирку.

Рисунок 5 – Посев культуры строго анаэробных микроорганизмов с использованием модификации метода вращающихся пробирок Р. Хангейта

существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбивают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду (рисунок 7). Микроселектор Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

1.3 Оценка чистоты выделенной культуры микроорганизмов

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

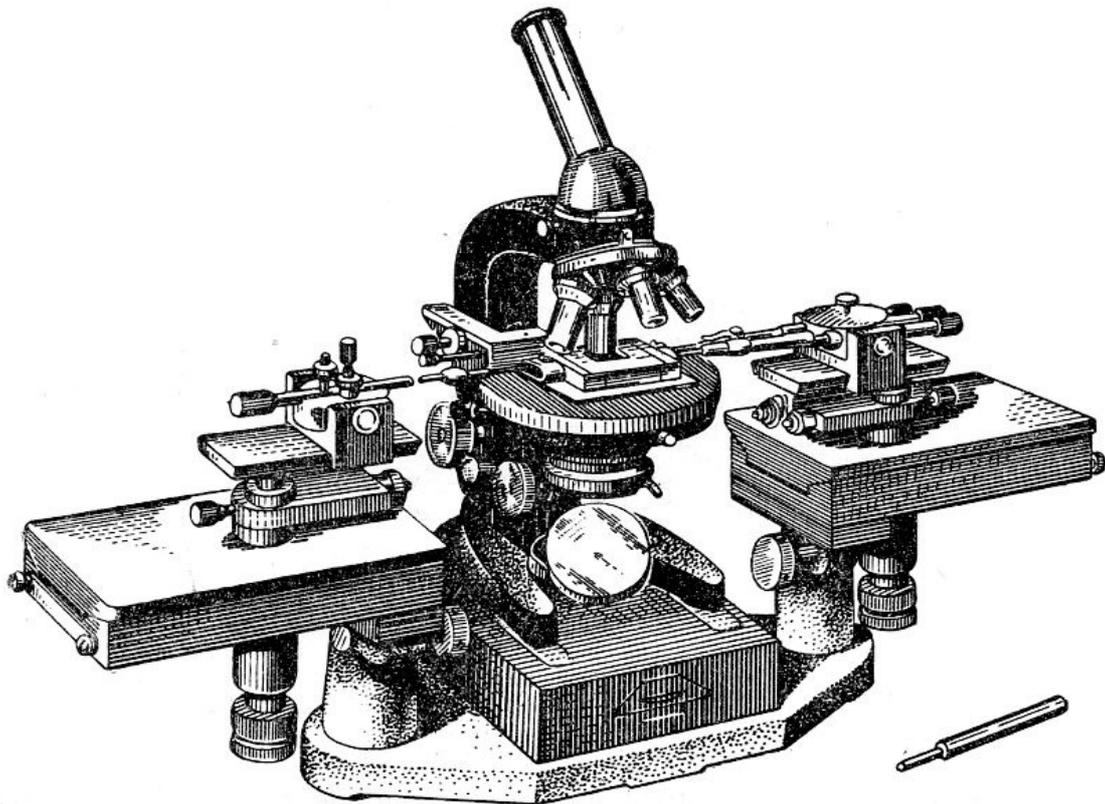


Рисунок 6 – Микроманипулятор вместе с микроскопом

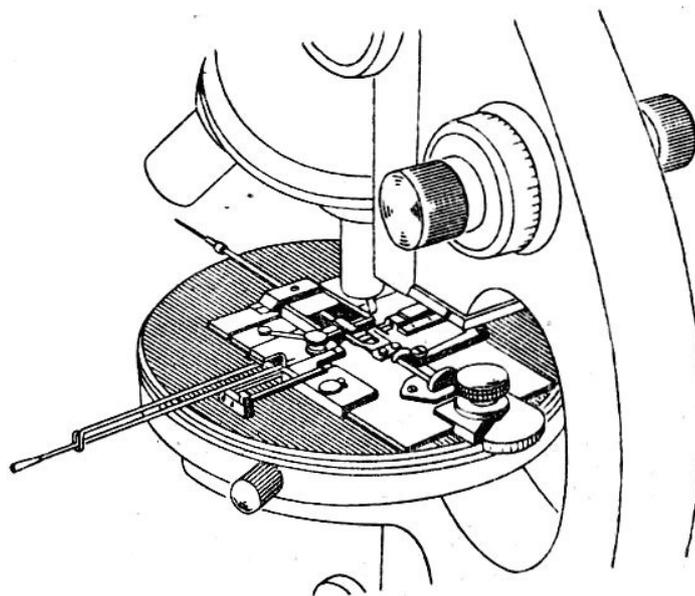


Рисунок 7 – Микроселектор Б.В. Перфильева

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом. Для этого следует приготовить препарат фиксированных окрашенных клеток и посмотреть его с иммерсионной системой или сделать препарат живых клеток и посмотреть его, используя фазово-контрастное устройство. Чистая культура многих микроорганизмов, как правило, морфологически однородна; допустимо лишь незначительное варьирование

размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых бактерий, например микобактерий, нокардий и др., очень полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании вызывает некоторые затруднения. Чистоту культур микроорганизмов обязательно проверяют высевом на питательные среды. Прежде всего, выделенную культуру высевают на питательную среду, благоприятную для ее роста. Однородность выросших колоний — свидетельство чистоты культуры. Обязателен посев на мясопептонный агар — среду, которая обеспечивает рост многих хемогетеротрофов. Критерием чистоты культуры является однородность выросших колоний или отсутствие роста, если данные микроорганизмы на мясопептонном агаре не развиваются.

Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на МПА.

Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофов, склонных развиваться с одним или несколькими спутниками.

Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют высевом еще на ряд сред — сусло, мясопептонный бульон, картофельный агар и др. Набор сред и их состав определяются особенностями метаболизма выделенных микроорганизмов, а также их возможных спутников.

1.3.1 Оценка чистоты выделенной культуры

Цель работы – освоить навык оценки чистоты выделенной культуры микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

Приготовьте микропрепарат из чистой культуры, зафиксируйте его и окрасьте по Граму. Исследуйте микропрепарат с помощью светлупольной иммерсионной микроскопии. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 4, обозначив один, два или более типов клеток. Сделайте заключение о чистоте выделенной культуры.

Таблица 4

Результат микроскопии чистой культуры	Обозначения

2 Методы идентификации чистых культур микроорганизмов

2.1 Методы оценки морфологических свойств микроорганизмов

2.1.1 Изготовление нативных препаратов (содержащих живые клетки) микроорганизмов

Цель работы – освоить практические навыки изготовления нативных препаратов микроорганизмов.

Для изучения живых клеток микроорганизмов применяют препараты «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток», «агаровая пленка»

(«микрокультура»). Эти препараты можно использовать как для оценки подвижности бактерий, так и для оценки прижизненной формы микроорганизмов, их жизненных циклов, особенностей размножения и формирования покоящихся форм.

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора, помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Микроорганизмы, выращенные и на плотной, и в жидкой питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей; выращенные в жидкой среде можно переносить также стерильной пипеткой. В последнем случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы из-под покровного стекла не выступал избыток жидкости. Если он образовался, его необходимо удалить фильтровальной бумагой. При продолжительном изучении микроскопируемого объекта края покровного стекла рекомендуется залить лаком для ногтей, что предотвратит быстрое высыхание препарата.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей или обычным пером наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре (рисунок 8). 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.

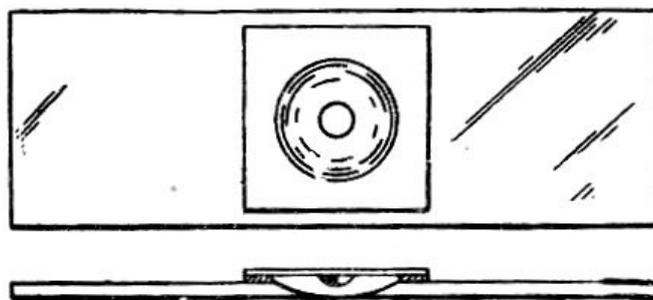


Рисунок 8 – Препарат «висячая капля». Вид сверху и сбоку

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего (1:40) на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом. Препарат «отпечаток» используют в основном при исследовании спороношения стрептомицетов.

Препарат «микрокультура» (или «агаровая пленка»). На тонкое, простерилизованное и нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,2 - 0,3 мл горячей агаризованной питательной среды и распределяют по всей поверхности стекла. После застывания среды удаляют петлей лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов бактериальной петлей или пипеткой наносят каплю жидкой культуры или суспензии клеток микроорганизма. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку с выросшей микрокультурой наносят каплю красителя или каплю воды в случае подсыхания пленки и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Выращивание микроорганизмов непосредственно на предметном стекле позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами их роста и развития, изучать цикл развития, способ размножения (деление — почкование), влияние на эти процессы каких-либо агентов. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей микроколонии. Выращивание микроколонии можно проводить в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом, загерметизированным лаком) условиях.

Агаровую пленку можно нанести на покровное стекло и приготовить препарат «висячая капля». На таком препарате можно наблюдать движение бактерий по типу скольжения.

Методика выполнения работы.

Приготовьте из чистых культур микроорганизмов препараты «раздавленная капля», «висячая капля», препарат «отпечаток», препарат «микрокультура». Выполните световую микроскопию препаратов. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 5, обозначив названия микроорганизмов.

Таблица 5

Рисунки нативных препаратов с обозначениями	Обозначения
1 «Раздавленная капля»	
2 «Висячая капля»	
3 Препарат «отпечаток»	
4 Препарат «микрокультура»	

2.1.2 Изготовление препаратов фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов

Цель работы – освоить практические навыки изготовления фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов.

Получение фиксированных окрашенных препаратов включает

приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На обезжиренное спиртом предметное стекло помещают маленькую каплю водопроводной воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала, как для препарата «раздавленная капля». Полученную суспензию равномерно размазывают петлей на площади 1 - 2 см максимально тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонок, чтобы быстро высыхал после приготовления.

Высушивание мазка лучше всего производить при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание происходит медленно, препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить осторожно, не перегревая мазок, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

Фиксация препарата преследует несколько целей: убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними; обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу; сделать мазок более восприимчивым к окраске, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые. Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат обычно трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегревать мазок, так как при этом происходят грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например их сморщивание. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами. Фиксирующую жидкость наливают на мазок, либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксирующим раствором.

Окраска. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей хромофором является катион. Примерами кислых красителей служат эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители - метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристалл-виолет, сафранин — интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Различают простое и дифференциальное окрашивание микроорганизмов. В первом случае прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определенные структуры клетки и запасные вещества.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные палочки, лежащие над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают в нем в

течение 1 - 3 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в случае необходимости добавляют новую порцию красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективом 100х. Для получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо раствора красителя заранее пропитанную им фильтровальную бумагу. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки.

Фиксировать и окрашивать можно также и препараты-«отпечатки». Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Форму клеток и их расположение (цепочки, розетки, пакеты, тетрады и т.д.) выявляют, как правило, на препаратах «раздавленная капля» при светлорольной или фазово-контрастной микроскопии. Для определения формы клеток мелких палочковидных бактерий, таких как *Serratia marcescens*, готовят препарат фиксированных клеток и применяют простое окрашивание. Клетки мелких бактерий, имеющих выросты - простеки (роды *Caulobacter*, *Labrys*, *Prosthecomicrobium*, *Stella* и некоторые другие), целесообразно исследовать методом фазового контраста или в темном поле. Естественное расположение клеток в колонии микроорганизмов, а также спор и спороносцев у актиномицетов и мицелиальных грибов изучают на препарате «отпечаток».

Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

Приготовьте из чистых культур микроорганизмов фиксированные препараты, окрасьте их простым способом тушью и фуксином, а также дифференциальным способом по Граму. Проведите световую микроскопию препаратов. Результаты микроскопирования зарисуйте в таблице 6, обозначив названия микроорганизмов.

Таблица 6

Рисунки фиксированных препаратов с обозначениями	Обозначения
1 Окраска фуксином	
2 Окраска тушью	
3 Окраска по Граму	

2.2 Методы оценки культуральных свойств микроорганизмов

Культуральные свойства - это особенности роста культуры на твёрдых и жидких питательных средах.

2.2.1 Оценка роста микроорганизмов на твердой среде и описание колоний

Цель работы – освоить практические навыки оценки роста микроорганизмов на твердой среде и описания колоний.

При описании колоний бактерий на плотных питательных средах (МПА, кровяной агар и др.) в проходящем свете отмечают величину колоний (крупные – от 4 до 5 мм в диаметре и более; средние – 2 - 4 мм; мелкие – 1 - 2 мм и точечные - меньше 1 мм), их форму (рисунок 9). В отраженном свете определяют цвет (бесцветная, пигментированная), характер поверхности (гладкая, шероховатая, бугристая, складчатая, блестящая, матовая), профиль колонии (рисунок 10).

При изучении колоний под микроскопом чашку помещают на предметный столик дном вверх. Обращают внимание на характер края колонии (рисунок 11), структуру (гомогенная, зернистая, струйчатая). При взятии бактериального материала петлёй отмечают консистенцию колонии (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, жёсткая).

Методика выполнения работы.

Опишите культуральные свойства изучаемых микроорганизмов при росте на твердой среде в соответствии с вышеизложенной схемой.

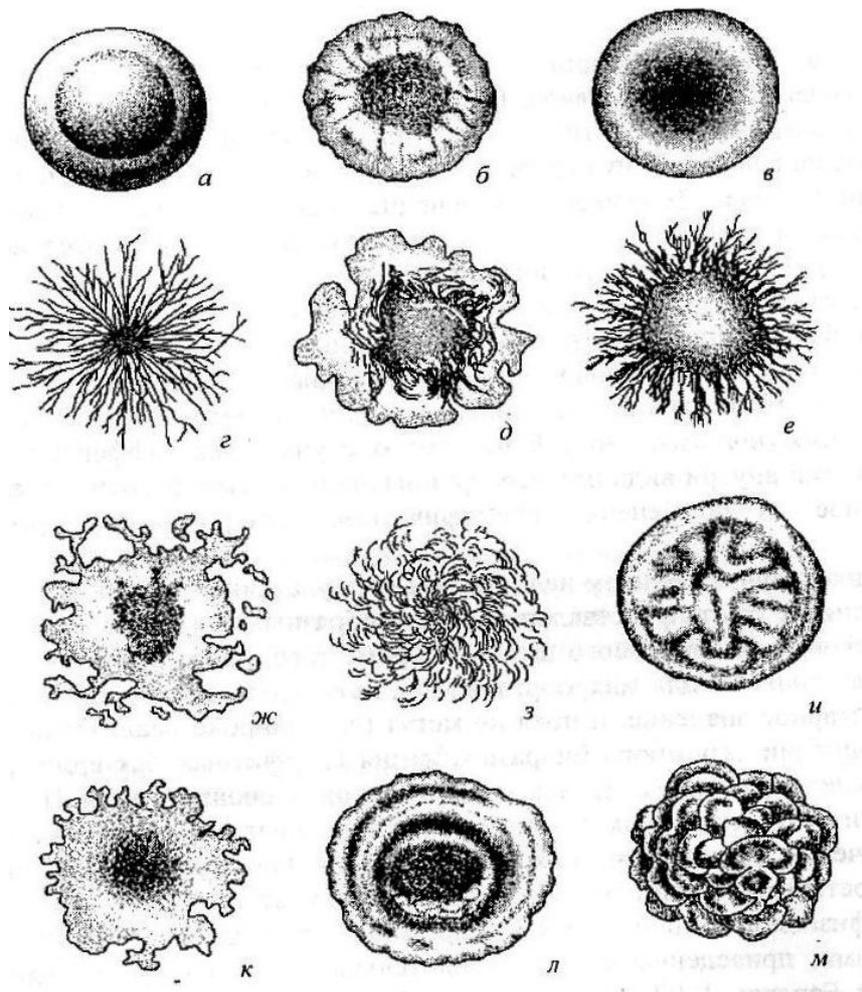
2.2.2 Оценка роста микроорганизмов на жидкой среде

Цель работы – освоить практические навыки оценки роста микроорганизмов на жидкой среде.

При описании роста культуры в жидкой питательной среде (МПБ, сахарный бульон) указывают интенсивность роста, наличие и характер помутнения (однородное, хлопьевидное), плёнки (кольцеобразная или сплошная, тонкая или толстая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, сухая или слизистая, сползающая или опадающая), осадка (рыхлый, плотный, хлопьевидный, зернистый, слизистый).

Методика выполнения работы.

Опишите культуральные свойства изучаемых микроорганизмов при росте на жидкой среде в соответствии с вышеизложенной схемой.



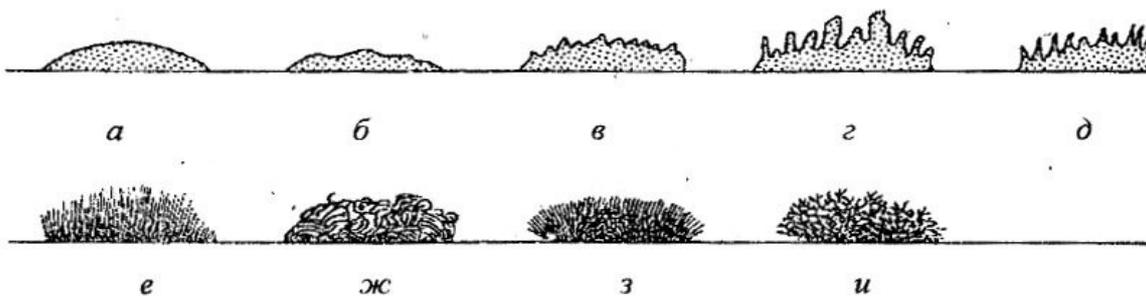
а - круглая; б - круглая с фестончатым краем; в - круглая с валиком по краю; г, д - ризоидные; е - круглая с ризоидным краем; ж - амёбовидная, з - нитевидная; и - складчатая; к - неправильная; л - концентрическая; м - сложная.

Рисунок 9 – Формы колоний микроорганизмов



а - изогнутый; б - кратеровидный; в - бугристый; г - врастающий в агар; д - плоский; е - выпуклый; ж - каплевидный; з – конусовидный.

Рисунок 10 – Профиль колоний микроорганизмов



а - гладкий; б - волнистый; в - зубчатый; г - лопастной; д - неправильный;
е - реснитчатый; ж - нитчатый; з - ворсинчатый; и – ветвистый.

Рисунок 11 - Край колонии

2.3 Методы оценки физиолого-биохимических свойств микроорганизмов

2.3.1 Экспресс-оценка физиолого-биохимических свойств чистой культуры микроорганизмов

2.3.1.1 Оценка типа клеточной стенки бактерий методом «тяжа»

Цель работы – освоить практический навык оценки типа клеточной стенки бактерий методом «тяжа».

Как считают, в большинстве случаев интерпретация результатов окраски мазка по Граму не представляет трудностей, однако некоторые грамположительные микроорганизмы, в частности представители рода *Bacillus*, могут иметь грамотрицательную окраску. Напротив, некоторые штаммы грамотрицательных родов *Acinetobacter* и *Moraxella* проявляют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, поэтому выглядят грамположительными.

Для уточнения таких «грам-сомнительных» реакций предложены особые методы. В Японии предложили метод, позволяющий отличить с помощью КОН-теста грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода с КОН лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроокиси калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

Методика выполнения работы.

Постановка пробы с КОН предусматривает субсидирование петли суточной агаровой культуры в капле 3 % раствора КОН на предметном стекле. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петлей на 0,5 – 2,0 см и даже дальше. Учет этой пробы более удобен на черном фоне.

Образование слизистой консистенции после обработки грамотрицательных бактерий КОН обусловлено выходом из их клеток ДНК, являющейся вязким компонентом.

Учтите результат реакции, сделайте заключение о типе клеточной стенки исследуемой культуры.

2.3.1.2 Оценка каталазной активности бактериальной культуры

Цель работы – освоить практический навык оценки каталазной активности бактериальной культуры.

В процессе идентификации бактерий часто применяется тест на каталазу, положительный, к примеру, у всех энтеробактерий, за исключением отдельных представителей рода *Yersinia*. Некоторые бактерии, например молочнокислые, на средах, не содержащих глюкозу или с ее низкими концентрациями, образуют негемовую «псевдокаталазу». Образование «псевдокаталазы» можно предотвратить введением в среду глюкозы до концентрации 1 %.

Методика выполнения работы.

Каплю перекиси водорода (3 % раствор) наносят на предметное стекло и вносят туда же петлю исследуемой культуры. В присутствии каталазы образуются пузырьки водорода. Каплю перекиси водорода можно наносить непосредственно на колонию и следить за выделением газа. В качестве положительного контроля могут быть использованы штаммы *Pseudomonas sp.*, отрицательного – *Agrobacterium sp.*

Учтите результат реакции, сделайте заключение о каталазной активности исследуемой культуры.

2.3.1.3 Оценка оксидазной активности бактериальной культуры

Цель работы – освоить практический навык оценки оксидазной активности бактериальной культуры.

Цитохромы - железосодержащие гемопротеиды, которые в завершающем этапе аэробного дыхания доставляют кислороду электроны (водород) с последующим образованием воды (H_2O). Из числа цитохромов в составе некоторых грамотрицательных бактерий содержится цитохром С. Благодаря ферменту оксидазе, свойственной аэробным или факультативно анаэробным микроорганизмам, происходит окисление цитохрома С, который способен использовать некоторые красители в качестве искусственных акцепторов водорода, обуславливая их переход в окрашенное состояние.

Классический метод определения наличия цитохромоксидазы связан с именем Эрлиха и воспроизведен им на животных в 1885 г. Для выявления этого фермента у микроорганизмов на поверхность 18 - 20-часовой агаровой культуры наносят каплю 1 % водного раствора пара-диметилфенилендиамина и добавляют каплю 1 % спиртового раствора альфа-нафтола. При положительной реакции через 1 - 3 мин появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенола синего.

Классический метод выявления цитохромоксидазы подвергся модификациям. Одной из них является широко применяемый за рубежом метод Ковача, предусматривающий использование одного реактива – 1 % водного раствора пара-тетраметил-фенилендиамина, который наносят на культуру (несколько капель). При положительной реакции через 20 - 30 с появляется темно-красное окрашивание, обусловленное переходом упомянутого реактива под воздействием окисленного цитохрома С в вурстеровский синий.

Механизмы реакций в тестах на цитохромоксидазу по методам Эрлиха и

Ковача различны, поэтому их результат у некоторых микроорганизмов бывает неодинаков. Так, в числе грам-отрицательных микроорганизмов, от которых иногда необходимо дифференцировать эитеробактерии, один из видов *Flavobacterium* – *F. meningosepticum* в тесте по Эрлиху дает отрицательную реакцию, а в тесте по Ковачу — положительную. Лишь за этим исключением у всех микроорганизмов характер реакций в тестах на наличие цитохромоксидазы, определенных обоими методами, совпадает.

Методика выполнения работы.

Небольшое количество культуры из колонии снимают деревянной стерильной палочкой (спичкой или зубочисткой) и втирают в течение 2 мин в тест-полоску “ОХУ-test” фирмы “LACHEMA” для определения оксидазы. Если в течение 2 мин полоска посинеет, значит, бактерии синтезируют цитохромоксидазу. Оксидазоположительными являются штаммы *Pseudomonas* sp., оксидазоотрицательными – *Escherichia coli*.

Учтите результат реакции, сделайте заключение об оксидазной активности исследуемой культуры.

2.3.2 Классические методы исследования биохимической активности микроорганизмов

Используемые для идентификации тесты весьма разнообразны, некоторые из них необходимы для идентификации многих групп бактерий, в других случаях их постановки не требуется. Постановка биохимических тестов требует особенной тщательности и внимания при приготовлении используемых сред, постоянного контроля за чистотой выделенной и идентифицируемой культуры, повторения (независимого) каждого теста не менее двух раз, использования при постановке тестов культур с заведомо положительной и отрицательной реакцией. Учет результатов при постановке физиолого-биохимических тестов проводится в течение 24 - 96 часов (если нет особых указаний).

2.3.2.1 Оценка способности бактериальной культуры к анаэробному росту

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к анаэробному росту.

Пробирки с 1 мл питательной среды (МПА) перед посевом кипятят на водяной бане 10 - 15 мин, затем быстро охлаждают. Исследуемую культуру засевают уколом в столбик агара, сверху посев заливается 10 мл полужидкого агара (перед употреблением прокипятить 10 - 15 мин и быстро охладить). Культивировать в эксикаторе с пониженным содержанием кислорода или под слоем стерильного вазелинового масла (1 см).

Методика выполнения работы.

После культивирования отмечают характер роста: если на поверхности среды - исследуемые микроорганизмы относятся к аэробам; если только в

глубине или на дне столбика агара - к облигатным анаэробам, равномерный рост по всему уколу указывает, что выросшие микроорганизмы - факультативные анаэробы, на некотором расстоянии от поверхности - на их принадлежность к микроаэрофилам. Таким образом, бактерии, способные к анаэробному росту, будут образовывать глубинные колонии по всей толщине полужидкого агара.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности исследуемой бактериальной культуры к анаэробному росту.

2.3.2.2 Оценка окислительного и ферментативного метаболизма глюкозы исследуемой культурой бактерий (тест Хью-Лейфсона, О/Ф тест)

Цель работы – освоить практический навык оценки окислительного и ферментативного метаболизма глюкозы исследуемой культурой бактерий.

Готовится среда следующего состава (г/л): пептон ферментативный – 2,0; NaCl - 2,0; K₂HPO₄ - 0,3; агар – 0,5 %; pH - 7,2. Автоклавирруется при 0,5 атм 20-25 мин. Отдельно стерилизуется 10 % водный раствор глюкозы или другого углевода, который вносят в среду перед использованием из расчета 10 мл на 100 мл среды. Также после автоклавирования вносят один из индикаторов, например, бромтимоловый синий - 3 мл 1 % раствора. При подборе индикатора следует убедиться, что он не подавляет рост микроорганизма. Все индикаторы плохо растворимы в воде и используются в средах очень низких концентрациях. Среду разливают по пробиркам.

Исследуемые культуры засевают параллельно в 2 пробирки, одна из которых заливается стерильным вазелиновым маслом. Результаты регистрируются ежедневно.

Методика выполнения работы.

Организмы, сбрасывающие глюкозу (отрицательный оксидазный тест, F-реакция, *Escherichia coli*), образуют кислоту в пробирке с маслом. Об этом судят по изменению окраски индикатора. Микроорганизмы с окислительным типом метаболизма (оксидазоположительные, O-реакция, *Pseudomonas sp.*) образуют кислоту только в открытой пробирке. Кислота образуется вначале только в верхней части среды. Если кислота образовалась в обеих пробирках, значит, микроорганизм способен расщеплять углевод как путём окисления, так и путем брожения. Если кислота не образуется ни в одной из пробирок, бактерии не катаболизируют углевод, если рост вообще отсутствует, возможно, в среде нет какого-либо питательного вещества, необходимого для роста.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о типе окислительного или ферментативного метаболизма глюкозы исследуемой культурой.

2.3.2.3 Оценка сахаролитической активности бактериальной культуры

Цель работы – освоить практический навык определения сахаролитической активности бактериальной культуры.

Способность микроорганизмов разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты, а иногда и газа изучают на средах Гисса. Отечественная промышленность выпускает сухие углеводные среды с индикатором ВР (голубой водный + розоловая кислота). Состав этих сред и способ приготовления указаны на этикетке флакона. Готовые среды являются полужидкими. При необходимости нужный углевод можно добавить в среду следующего состава: пептон - 10 г, хлорид натрия - 5 г, дистиллированная вода - 1 л, индикатор (например, 1,6 % спиртовой раствор бромтимолового синего) – 0,1 %, агар-агар – 0,4 %. Углевод добавляется в количестве 0,5 % (адонит, глицерин, сорбит, дульцит, целлобиоза, рафиноза, трегалоза, салицин, арабиноза, мальтоза, рамноза, ксилоза) или 1 % (глюкоза, лактоза, маннит, сахароза). Ряд углеводов (дисахариды, ксилоза, рамноза, салицин, глицерин, арабиноза) являются термолабильными и их предпочтительнее стерилизовать отдельно в виде 10 % водных растворов фильтрацией или текучим паром 2 дня по 30 мин, а затем добавлять в нужной концентрации в стерильную питательную среду. После добавления углевода устанавливают рН 7,1-7,2.

Приготовленную среду Гисса разливают в стерильные пробирки по 3-4 мл и стерилизуют 30 мин при 112 °С.

Методика выполнения работы.

Посев исследуемой культуры в среды Гисса осуществляют уколом, инкубируют от 24 ч до 14 суток. Об использовании микроорганизмом данного углевода судят по изменению цвета индикатора в кислую сторону (таблица 7). Если разложение углевода сопровождается газообразованием, то в толще агаризованной среды через 24-48 ч образуются пузырьки газа или происходит разрыв агара.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о сахаролитической активности исследуемой бактериальной культуры.

Таблица 7 - Изменение цвета индикаторов в зависимости от рН среды

Индикаторы	рН<7	рН=7	рН>7
1 Андреде	красный	розовый	бесцветный
2 Бромкрезоловый пурпурный	желтый	фиолетовый	синий
3 Бромтимоловый синий	желтый	зеленый	синий
4 ВР (голубой водный + розоловая кислота)	синий	бесцветный	розовый
5 Бромфеноловый красный	желтый	красный	малиновый

2.3.2.4 Оценка продукции ацетона исследуемой культурой бактерий (реакция Фогес-Проскауэра)

Цель работы – освоить практический навык оценки продукции ацетона исследуемой культурой бактерий.

Промежуточный продукт расщепления глюкозы - ацетон (ацетил-метилкарбинол) можно выявить с помощью теста Фогес-Проскауэра. Для его проведения используется среда Кларка: K_2HPO_4 – 0,5 г, пептон – 0,7 г, глюкоза – 0,5 г, вода дистиллированная - 100 мл. Компоненты растворяют в воде,

кипятят 2-3 мин, устанавливают рН 6,9, разливают в пробирки по 3-4 мл. Посевы на среде Кларка инкубируют в течение 4-5 суток.

Методика выполнения работы.

После окончания культивирования 1 мл культуры переливают в чистую пробирку, добавляют 0,6 мл 5 % раствора альфа-нафтола в 70 % спирте, тщательно перемешивают, затем добавляют 0,2 мл 40 % водного раствора КОН, вновь перемешивают и ставят на инкубацию в наклонном положении на 1 ч. При наличии ацетона среда окрашивается в красный цвет.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности исследуемой культуры к продукции ацетона.

2.3.2.5 Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу крахмала

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к гидролизу крахмала.

Готовится среда с крахмалом: МПА с 1 % крахмала или любая другая среда, не содержащая глюкозы, с 1 % крахмала (в присутствии глюкозы микроорганизмы крахмал не используют). Исследуемая культура засеивается на 2 чашки с крахмальной средой коротким штрихом, инкубируется в течение 4-х суток.

Методика выполнения работы.

После окончания срока инкубации на поверхность одной чашки наливается раствор Люголя, избыток реактива удаляется пипеткой. Если исследуемый микроорганизм расщепляет крахмал, то вокруг выросшей культуры образуется прозрачная зона, остальные же участки среды приобретают тёмно-синюю окраску за счёт взаимодействия крахмала с йодом. При отрицательном результате вторая чашка инкубируется ещё трое суток. Результат теста учитывается аналогично.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности исследуемой культуры к гидролизу крахмала.

2.3.2.6 Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу мочевины

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к гидролизу мочевины.

Бактерии, обладающие ферментом уреазой, способны гидролизовать мочевину с образованием аммиака и углекислоты, при этом рН среды сдвигается в щелочную сторону, что устанавливается при помощи индикатора фенолрота.

Наличие уреазы выявляется на среде Кристенсена: пептон - 1 г, NaCl - 5 г, KH_2PO_4 - 2 г, агар-агар - 20 г, глюкоза - 1 г, 0,2%-ный раствор фенолрота - 6 мл, вода - 1 л. Полученную среду простерилизовать при 112 °С в течение 30 мин, охладить до 50 °С и добавить 40 мл 50 % раствора мочевины, выдержанного в течение 3-х суток в герметично закрытой посуде. Среду разлить в стерильные

пробирки и скосить.

Исследуемая культура засеивается на среду Кристенсена штрихом, культивируется в течение 1 - 4 суток.

Некоторые виды бактерий не способны расти на среде Кристенсена. В этом случае для обнаружения уреазы используют тест с субстратом (мочевинной) и концентрированную бактериальную суспензию без выращивания микроорганизма на питательной среде с мочевиной. Готовят два раствора. Раствор 1: вода - 4 мл, этанол - 2 мл, мочевины - 2 г. Компоненты смешивают, раствор хранят в холодильнике, не стерилизуя. Раствор 2: 0,2 % водный раствор фенолрота - 1 мл, K_2HPO_4 - 0,1 г, K_2HPO_4 - 0,1 г, NaCl - 0,5 г, вода - 100 мл. Компоненты смешивают и стерилизуют текучим паром в течение 60 мин. Перед использованием смешивают 1 часть раствора 1 и 19 частей раствора 2. Полученную смесь разливают в стерильные узкие (преципитационные) пробирки по 0,1 мл, 1 - 2 бактериологические петли 24-часовой культуры исследуемого микроорганизма суспендируют в смеси растворов и помещают в термостат на 30 мин. Положительный результат - покраснение среды.

Методика выполнения работы.

После культивирования учтите цвет среды. Покраснение среды будет свидетельствовать о наличии у микроорганизма фермента уреазы.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности исследуемой культуры к гидролизу мочевины.

2.3.2.7 Оценка способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу желатина

Цель работы – освоить практический навык оценки способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу желатина.

Под воздействием фермента желатиназы происходит разжижение желатина. Желатин представляет собой растворимые белки, извлечённые из коллагена, которые при температуре ниже 25 °С образуют плотный гель. Желатиназа гидролизует аминокислоты белков желатина, в результате чего гель разжижается.

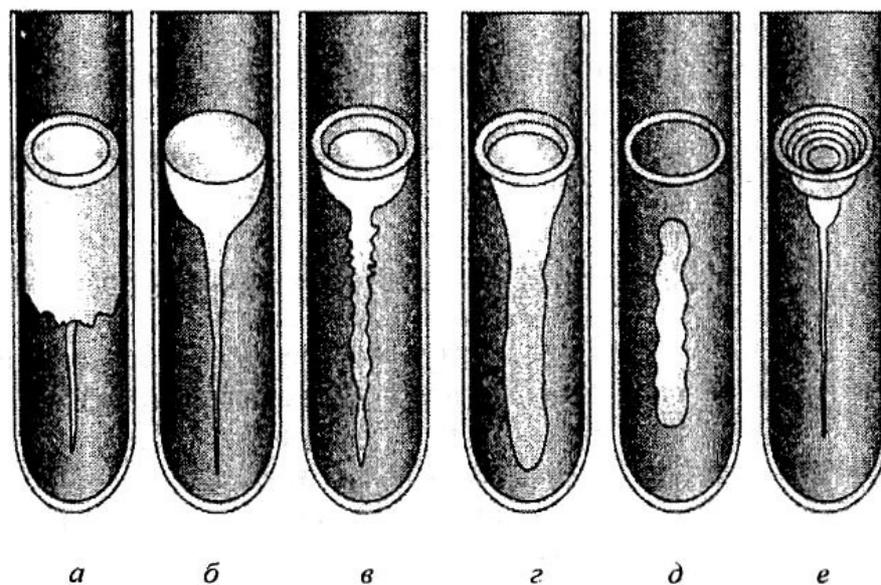
Готовится мясо-пептонная желатина: МПБ с 32 % желатин. Желатина замачивается в холодной воде на 15-20 мин, затем добавляется навеска сухого питательного бульона и полученная смесь доводится до кипения на водяной бане. Готовая среда разливается в пробирки по 4 мл, стерилизуется при 121 °С в течение 20 мин.

Исследуемая культура засеивается в мясо-пептонную желатину уколом, культивируется при температуре не более 25 °С в течение 1-7 суток.

Методика выполнения работы.

При анализе результата учитывается скорость реакции и характер разжижения (рисунок 12).

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о желатиназной активности исследуемой культуры.



а - послойное; б - воронковидное; в - кратеровидное; г - мешковидное; д - анаэробное; е – чашевидное.

Рисунок 12 – Характер разжижения желатина микроорганизмами при посеве уколом

2.3.2.8 Оценка способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу казеина

Цель работы – освоить практический навык оценки способности исследуемой культуры бактерий к гидролизу казеина.

Под воздействием фермента казеиназы происходит гидролиз молочного белка казеина.

Для теста используется обезжиренное молоко (1,5 % жирности), которое стерилизуется дробно в течение 3-х дней. К стерильному МПА добавляется молоко в расчёте 2 мл на 10 мл среды, перемешивается и готовая среда сразу же разливается по чашкам.

Исследуемая культура засеивается коротким штрихом, посевы инкубируются в течение 7-14 дней.

Методика выполнения работы.

После окончания срока инкубации поверхность среды заливают 10 % раствором соляной кислоты. Просветление среды вокруг посева будет свидетельствовать о наличии у микроорганизма фермента казеиназы.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о казеинолитической активности исследуемой культуры.

2.3.2.9 Оценка способности бактериальной культуры к продукции побочных газообразных продуктов расщепления пептонов

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции побочных газообразных продуктов расщепления пептонов.

Пептоны - промежуточные продукты распада белков. При их расще-

плении микроорганизмами в качестве побочных продуктов могут выделяться аммиак, сероводород и индол. Источниками образования сероводорода могут быть различные органические (цистеин, цистин, метионин) и неорганические (сульфат, сульфит, тиосульфат) соединения серы. Индол (орто-бензопирилл) образуется в результате глубокого расщепления аминокислоты триптофана.

Исследуемая культура засеивается в МПБ. Над поверхностью среды с помощью пробки закрепляются 3 индикаторные бумажки: для улавливания аммиака - лакмусовая бумажка, для выявления сероводорода - бумага, пропитанная 5 % водным раствором уксуснокислого свинца, для выявления индола - бумага, пропитанная насыщенным раствором щавелевой кислоты. Кончики индикаторных бумажек перед применением смачивают стерильной водой. Пробирки с посевами желательно закрыть герметично для предотвращения улетучивания газообразных продуктов. За цветом индикаторных бумажек наблюдают в течение 2-х недель.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет индикаторных бумажек. При образовании аммиака лакмусовая бумажка посинеет, при выделении сероводорода соответствующая индикаторная бумажка почернеет за счёт образования сульфида свинца, если микроорганизм способен к выделению индола, индикаторная бумажка, пропитанная щавелевой кислотой, приобретёт розовый цвет.

Однако данный способ позволяет выявить лишь большие количества газообразных продуктов.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности исследуемой культуры к продукции побочных газообразных продуктов расщепления пептонов.

2.3.2.10 Оценка способности бактериальной культуры к продукции сероводорода

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции сероводорода.

Чувствительным способом обнаружения сероводорода является посев исследуемой культуры уколом в высокий столбик МПА, содержащего 0,03 % тиосульфата натрия и 0,015 % сульфата железа.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды. При образовании сероводорода будет наблюдаться почернение среды по уколу.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к продукции сероводорода.

2.3.2.11 Оценка способности бактериальной культуры к продукции индола

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции индола.

Чувствительным методом обнаружения индола является культивирование исследуемого микроорганизма в жидкой питательной среде, богатой триптофаном (МПБ с 0,1 % L-триптофана). Среда не должна содержать углеводы, которые могут ингибировать индолообразование.

Методика выполнения работы.

Ежедневно в течение недели по 1 мл исследуемой жидкой культуры отливается в чистую пробирку и туда же добавляется 1 мл эфира или ксилола для экстракции образовавшегося индола. Смесь перемешивают и дают ей отстояться. Затем осторожно добавляют 0,5 мл реактива Эрлиха (парадиметиламинобензоальдегид - 1 г, этанол - 96 мл, соляная кислота - 20 мл; в этиловом спирте растворяют пара-диметиламинобензоальдегид, затем добавляют кислоту; реактив хранят в тёмной склянке). Результат учитывают через 5 минут. Если изучаемый микроорганизм образует индол, то на границе культуры и слоя эфира (ксилола) появляется красно-фиолетовое окрашивание в виде диска.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к продукции индола.

2.3.2.12 Оценка способности бактериальной культуры к редукции нитратов

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к редукции нитратов.

Многие микроорганизмы способны восстанавливать нитраты до нитритов и далее до аммиака и свободного азота.

Исследуемая культура засеивается на нитратный бульон (МПБ с 0,2 % KNO_3). Перед посевом с помощью смеси реактивов 1 и 2 необходимо проверить среду на отсутствие в ней нитритов. Посевы инкубировать в течение 3-4 суток. Для проведения теста необходимо приготовить два реактива. Реактив 1: крахмал - 1 г, КJ – 0,5 г, вода - 100 мл (крахмал растворить в воде, прокипятить, затем добавить КJ). Реактив 2: 10 % раствор серной кислоты. Перед применением реактивы смешивают в равных частях, смешанный реактив годен в течение 15 минут. При внесении смеси реактивов в среду, содержащую нитриты, наблюдается синее окрашивание за счёт выделения из КJ металлического йода, взаимодействующего с крахмалом.

Методика выполнения работы.

После окончания срока инкубации в пробирку с бульонной культурой добавляется 1 мл смешанного реактива. Появление синего окрашивания будет свидетельствовать о расщеплении микроорганизмом нитрата до нитрита. Если изменения цвета не произошло, то к среде добавляют щепотку порошка цинка. Цинк вытесняет из серной кислоты водород, который восстанавливает имеющийся в среде нитрат в нитрит, вследствие чего происходит посинение среды. В этом случае результат теста на способность к редукции нитрата считают отрицательным. Если же посинения среды не произошло и после добавления цинка, то это будет означать, что в среде отсутствует как нитрат,

так и нитрит. Следовательно, данный микроорганизм расщепил нитрат до аммиака и свободного азота и результат теста будет считаться положительным.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к редукции нитратов.

2.3.2.13 Оценка способности бактериальной культуры к использованию цитрата натрия

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к использованию цитрата натрия.

В специальной среде цитрат натрия служит единственным источником углерода. Его расщепление микроорганизмом приводит к образованию щелочных продуктов. Для выявления способности бактерий к использованию цитрата натрия применяется цитратный агар Симмонса или цитратный агар Кристенсена, которые выпускаются в виде сухих смесей. Среду готовят по рецепту, указанному на упаковке, затем ее разливают в пробирки по 4 мл и стерилизуют при 120 °С в течение 20 мин. Простерилизованную среду скашивают, оставляя небольшой столбик. Исследуемую культуру засевают уколом в столбик и штрихом по скошенной поверхности, инкубируют 1-3 суток.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды. Положительный результат - защелачивание среды, которое регистрируется с помощью индикатора, например агар Симмонса приобретает синий цвет вместо оливково-зеленого.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к использованию цитрата натрия.

2.3.2.14 Оценка способности бактериальной культуры к редукции метиленового синего

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к редукции метиленового синего.

При окислительно-восстановительных реакциях у бактерий акцептором электронов помимо атомарного кислорода могут быть органические красители, которые, присоединяя электрон, восстанавливаются и обесцвечиваются.

К 100 мл обезжиренного молока добавляется 2 мл 1 % водного раствора метиленового синего. Среда разливается в пробирки по 5 мл, стерилизуется дробно на водяной бане.

Исследуемая культура засеивается в молоко, инкубируется 24 ч.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды. Положительный результат - обесцвечивание молока (при слабой реакции молоко окрашивается в зелёный цвет).

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к редукции метиленового синего.

2.3.2.15 Оценка способности бактериальной культуры к продукции лизин-, орнитиндекарбоксилаз и аргининдегидролазы

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции лизин-, орнитиндекарбоксилаз и аргининдегидролазы.

При расщеплении карбоксильных групп лизина и орнитина образуются амин или диамин и CO_2 . Аргинин утилизируется до путресцина и CO_2 , а при наличии уреазы - до NH_3 и CO_2 . Во всех случаях происходит защелачивание среды.

Готовятся среды с аминокислотами: мясная вода - 40 мл, вода - 60 мл, пептон – 0,5 г, глюкоза – 0,1 г, индикатор – 0,5 мл, аминокислота - 1 г (если DL-форма - 2 г). Среда разливается в пробирки по 3 мл, стерилизуются при 112 °С в течение 30 мин.

Культивирование исследуемого микроорганизма осуществляют в течение 24-72 ч.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды. Положительный результат - изменение цвета индикатора в щелочную сторону, например посинение среды с бромтимоловым синим.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к продукции лизин-, орнитиндекарбоксилаз и аргининдегидролазы.

2.3.2.16 Оценка способности бактериальной культуры к продукции фенилаланиндезаминазы

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции фенилаланиндезаминазы.

Метод основан на выявлении фенилпировиноградной кислоты, образующейся из фенилаланина.

Готовится среда с фенилаланином: дрожжевой экстракт жидкий - 10 мл (сухой – 0,3 г), NaCl – 0,5 г, Na_2HPO_4 – 0,1 г, L-фенилаланин – 0,1 г (DL-форма – 0,2 г), голодный агар – 1,2 г, вода - 100 мл, устанавливается рН -7,0-7,2. Среда разливается в пробирки по 3 мл, стерилизуется при 112 °С в течение 30 мин, скашивается.

Исследуемая культура засеивается штрихом на поверхность среды с фенилаланином.

Методика выполнения работы.

Через 24 ч инкубации на поверхность среды наносится 5 капель 10 % водного раствора FeCl_3 . Оцените цвет среды. Положительный результат - зелёное окрашивание среды.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о способности бактериальной культуры к продукции фенилаланиндезаминазы.

2.3.3 Методы исследования факторов патогенности, учитываемых при идентификации некоторых таксонов микроорганизмов

2.3.3.1 Оценка гемолитической активности бактериальной культуры

Цель работы – освоить практический навык оценки гемолитической активности бактериальной культуры.

Гемолитическая активность - это способность микроорганизмов растворять эритроциты крови, обусловленная наличием экзотоксина - гемолизина.

Исследуемая культура засеивается на кровяной агар (стерильный МПА, охлаждённый до 45 °С с 5 % стерильной дефибрированной крови), инкубируется 1-2 суток.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды и наличие зон гемолиза вокруг исследуемых колоний микроорганизмов.

Гемолиз может быть трёх типов:

- альфа-гемолиз (частичный): вокруг колоний формируется зеленоватая зона за счёт образования метгемоглобина из гемоглобина частично лизированных эритроцитов;

- бета-гемолиз (полный): вокруг колоний формируется бесцветная зона, ширина которой зависит от гемолитической активности микроорганизма;

- альфа'-гемолиз: вблизи колонии узкая мутная зона частичного гемолиза, далее прозрачная зона полного гемолиза.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о гемолитической активности бактериальной культуры.

2.3.3.2 Оценка лецитиназной активности бактериальной культуры

Цель работы – освоить практический навык оценки лецитиназной активности бактериальной культуры.

Микроорганизмы, обладающие ферментом лецитиназой, способны расщеплять гидролизом лецитин - фосфорсодержащее жироподобное вещество, в большом количестве (9,5 %) присутствующее в желтке куриного яйца.

Исследуемый микроорганизм засеивается коротким штрихом на желточный агар: пептон - 20 г, Na₂HPO₄ – 2,5 г, NaCl - 1 г, 0,5 % раствор MgSO₄ - 0,1 мл, глюкоза - 1 г, агар-агар – 12,5 г, вода - 500 мл. Полученная смесь стерилизуется при 112 °С в течение 30 мин, охлаждается до 50 °С, затем к ней добавляется желток куриного яйца из расчёта 15 мл желтка на 0,5 л среды. Желток тщательно размешивается и среда сразу же разливается по чашкам. Культивирование осуществляется в течение 3-5 суток.

Более быстрым способом выявления лецитиназы является посев исследуемого микроорганизма в желточную эмульсию. В стерильной посуде смешивается 2 части желтка и 1 часть стерильной воды. Полученная смесь разливается в стерильные пробирки по 2 мл, 1-2 бактериологические петли 24-часовой культуры вносятся в полученную желточную эмульсию, тщательно перемешивается и инкубируется в термостате в течение 6-12 ч.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените цвет среды вокруг колоний. При положительной реакции (стафилококки, клостридии), на агаре появляется зона просветления, а на поверхности среды вокруг колонии формируется небольшой ореол помутнения, отливающий перламутровым блеском. При отрицательной реакции агаровая среда вокруг колоний не изменяется.

При посеве исследуемого микроорганизма в желточную эмульсию положительный результат выглядит как образование в пробирке плотного сгустка.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о лецитиназной активности бактериальной культуры.

2.3.3.3 Оценка способности бактериальной культуры к продукции плазмокоагулазы и фибринолизина

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к продукции плазмокоагулазы и фибринолизина.

В пробирку с 0,5 мл стерильной кроличьей или человеческой плазмы крови вносят 1 петлю исследуемой культуры, инкубируют при 37 °С. Результат учитывают через 30 мин, 2, 4 и 24 ч.

Методика выполнения работы.

После инкубации оцените состояние плазмы крови путем переворачивания пробирки. Положительный результат - образование плотного или рыхлого сгустка, который скатывается по стенке или остается неподвижным на дне пробирки.

Через несколько дней инкубации посева можно сделать вывод о фибринолитической активности микроорганизма: в присутствии фибринолизина образовавшийся сгусток растворяется.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о продукции плазмокоагулазы и фибринолизина бактериальной культурой.

2.3.3.4 Оценка способности бактериальной культуры к гидролизу ДНК или РНК

Цель работы – освоить практический навык оценки способности бактериальной культуры к гидролизу ДНК или РНК.

Для приготовления среды, содержащей нуклеиновые кислоты, используют 10 % растворы ДНК или РНК в дистиллированной воде. ДНК хорошо растворяется в воде, при растворении РНК в воду по каплям добавляют 1Н раствор NaOH (рН не более 5). Полученные растворы вносят в питательный агар из расчёта 2 мл на 100 мл среды.

Исследуемую культуру засевают штрихом на питательную среду с одной из нуклеиновых кислот, инкубируют 24-48 ч.

Методика выполнения работы.

После инкубации на поверхность агара наливают 1Н раствор HCl. Положительная реакция - образование вокруг культуры зоны просветления.

Учтите и зарисуйте результат реакции, сделайте заключение о

способности бактериальной культуры к гидролизу ДНК или РНК.

3 Методы выделения, идентификации и дифференциации бактерий сем. *Enterobacteriaceae*

3.1 Культуральные свойства энтеробактерий

Цель работы – освоить практический навык оценки культуральных свойств энтеробактерий на питательных средах (МПА, Эндо, висмут-сульфит агар).

В качестве дифференцирующих субстратов в средах для выделения энтеробактерий используют углеводы, аминокислоты и др., утилизация которых выявляется с помощью различных индикаторов (таблицы 8, 9).

Дифференцирующим субстратом в среде Плоскирева, Эндо, Мак Конки служит лактоза, по отношению к которой отличают бесцветные колонии бактерий, не ферментирующих этот углевод (шигеллы, сальмонеллы и др.), от окрашенных колоний бактерий, обладающих этой способностью (большинство эшерихий, клебсиелл, энтеробактеров, некоторые представители цитробактеров и др.).

Единственным, дифференцирующим признаком на висмут-сульфит агаре служит образование сероводорода, при наличии которого колонии имеют черную окраску с металлическим блеском и характерное почернение среды под ними; некоторые сальмонеллы формируют колонии с зеленой окраской различной интенсивности и разных оттенков.

Таблица - 8 - Характеристика колоний энтеробактерий на слабоселективно-дифференциальных средах

Среда	Дифференцирующие компоненты	Индикатор	Цвет колоний в зависимости от ферментации углеводов	
			+	-
ЭМС	Лактоза, сахароза	Эозин, метиленовый синий	Темно-синий с металлическим блеском	Бесцветный
Эндо	Лактоза	Основной фуксин	Красный с металлическим блеском	Бесцветный
Мак-Конки	Лактоза	Нейтральный красный	Красный	Бесцветный

Агар Эндо - слабоселективная дифференциально-диагностическая среда для выделения энтеробактерий. 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 (Na_2SO_3). Кроме того, присутствие в среде этих реагентов оказывает ингибирующее действие на грамположительную микрофлору. Бак-

терии, 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.

Агар Плоскирева - селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл. Готовая среда прозрачна, имеет розовато-желтоватый цвет.

Принцип действия: в состав среды входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протей; дифференцирующие свойства основаны на изменении рН в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют колонии брусничного цвета (индикатор нейтральный красный). Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабоокрашенных колоний. Вегетирующие свойства среды недостаточны для роста *Shigella dysenteriae I* и некоторых сальмонелл (*S. cholerae-suis*, *S. pullorum*).

Висмут-сульфит агар - строго селективная среда для выделения сальмонелл. Готовая среда непрозрачна, зеленовато-горохового цвета.

Принцип действия: бриллиантовый зеленый и висмут, который находится в среде в виде основного сульфита, подавляют рост грамположительной флоры и многих энтеробактерий, в том числе шигелл; рост сальмонелл также может быть несколько задержан, вследствие чего чашки с посевами просматривают через 24 и 48 ч; агглютинабельность сальмонелл, выросших на этой среде, значительно снижена. 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.

Таблица 9 - Характеристика колоний энтеробактерий на высокоселективно-дифференциальных средах

Среда	Дифференцирующие компоненты	Индикатор	Цвет колоний в зависимости от					
			ферментации углеводов		образования сероводорода		декарбоксилирования лизина	
			+	-	+	-	+	-
Бактоагар Плоскирева	Лактоза	Нейтральный красный	Розовый, красный	Бесцветный				
Висмут-сульфит агар	Глюкоза, сульфит висмута	Сульфат железа			Черный, зеленый	Бесцветный		
SS-агар	Лактоза, тиосульфат натрия	Нейтральный красный, цитрат железа	Красный	»	С черным центром	Без черного центра		
Дезоксихолат-цитратный агар Лейфсона	Лактоза, тиосульфат натрия	Нейтральный красный, цитрат железа	То же	»	То же	То же		
HE-агар	Лактоза, сахароза, салицин, тиосульфат натрия	Бромтимоловый синий, кислый фуксин, аммоний-железа цитрат	Оранжевый, желтоват-розовый	Сине-зеленый, зеленый	» »	» »		
XLD-агар	Лактоза, сахароза, ксилоза, лизин, тиосульфат натрия	Нейтральный красный, аммоний-железа цитрат	Желтый	Бесцветный	» »	» »	Красный	Бесцветный
Эт-2	Глюкоза, маннит, лизин, тиосульфат натрия	Аммоний-железа цитрат					С черным центром	Без черного центра

Методика выполнения работы.

Визуальную характеристику колоний получают, держа чашку в одной руке и осматривая поверхность агара на наличие микробного роста, а также просматривая его в проходящем дневном или искусственном свете. Во время осмотра чашку наклоняют в разных направлениях при достаточном освещении так, чтобы свет мог падать под различными углами; кроме того, можно применять также ручную лупу.

В числе характеристик колоний учитывают их размер (диаметр в миллиметрах), форму, возвышение над поверхностью (плоская, выпуклая), особенности края (ровный, волнистый и др.) и поверхности (блестящая, матовая и т. д.), цвет, плотность (прозрачная, мутная) и консистенцию (вязкая, пленчатая и др.).

Обращают также внимание на возможное образование пигмента, наличие специфического запаха, изменение цвета среды. Решающее значение при оценке роста энтеробактерий на пластинчатых средах имеет дифференциация по окраске изолированных колоний, зависящей от отношения бактерий к дифференцирующим компонентам сред.

Зарисуйте колонии различного типа на дифференциальных питательных средах (Эндо, висмут-сульфит агар) в таблице 10.

Опишите культуральные признаки исследуемых культур в таблице 11.

Запишите механизм селективного и дифференциального действия сред в таблице 10.

Таблица 10 - Рисунки исследуемых культур (каждая культура в своем секторе)

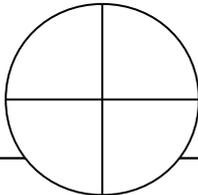
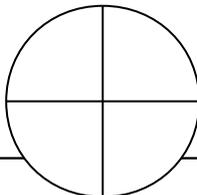
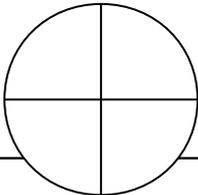
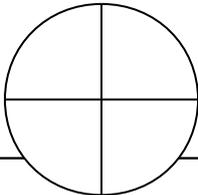
№ культуры	МПА	Эндо	Плоскирева	Висмут-сульфит агар
1				
2				
3				
4				
Механизм селективного действия среды				
Механизм дифференциального действия				

Таблица 11 - Культуральные признаки исследуемых культур

№ культуры	МПА	Эндо	Плоскирева	Висмут-сульфит агар
1				
2				
3				
4				

3.2 Морфо-физиологические характеристики энтеробактерий, общие для семейства

Цель работы – освоить практический навык оценки морфо-физиологических признаков чистой культуры, характерных для сем. *Enterobacteriaceae*.

При сомнении в принадлежности изучаемой культуры к семейству *Enterobacteriaceae* целесообразно применить следующие тесты, дифференцирующие семейства микроорганизмов: морфология (палочка, кокк) с окраской по Граму (+ или -), OF-тест, т. е. тип расщепления глюкозы - окисление (O) или ферментация (F), определение ферментов в тестах на цитохромоксидазу и нитратредуктазу (редукция нитратов в нитриты).

На основании тестов, указанных в таблице 12, приведены характеристики *Enterobacteriaceae* и некоторых микроорганизмов, не относящихся к этому семейству, присутствие которых в пробах материала и рост на питательных средах возможны при исследовании на энтеробактерии. Как видно, для энтеробактерий характерными признаками являются палочковидная форма клеток, грамотрицательная окраска, расщепление глюкозы ферментацией; отсутствие цитохромоксидазы и способность восстанавливать нитраты в нитриты (за исключением некоторых биоваров *Enterobacter* и *Erwinia*).

Выяснение морфологии клеток и отношения к окраске по Граму у сомнительных культур следует считать первоочередным, так как при этом исследовании могут быть выявлены характерные морфологические особенности (например, кокковая форма и др.), которые сразу же без других тестов дадут представление о микроорганизме.

Как считают, в большинстве случаев интерпретация результатов окраски мазка по Граму не представляет трудностей, однако некоторые грамположительные микроорганизмы, в частности представители рода *Bacillus*, могут иметь грамотрицательную окраску. Напротив, некоторые штаммы грамотрицательных родов *Acinetobacter* и *Moraxella* проявляют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, поэтому выглядят грамположительными.

Для уточнения таких «грам-сомнительных» реакций предложены особые методы. В Японии предложили метод, позволяющий отличить с помощью КОН-теста грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода с КОН лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроксида калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

Постановка пробы с КОН предусматривает субсидирование петли суточной агаровой культуры в капле 3 % раствора КОН на предметном стекле. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петлей на 0,5 – 2,0 см и даже дальше. Учет этой пробы более удобен на черном фоне.

Определение типа расщепления глюкозы (OF-тест) проводят с помощью среды Хью - Лейфсона. В этой среде в качестве углевода использована глюкоза, ферментация которой характерна для представителей семейства

Enterobacteriaceae, хотя могут быть применены и другие углеводы. При ферментативном процессе исходное расщепление глюкозы происходит в анаэробных условиях первичным фосфорилированием до образования соединения глюкоза-6-фосфат. Окислительный процесс расщепления глюкозы в отличие от этого начинается не с фосфорилирования, а с прямого окисления карбоксильной группы с образованием глюконовой кислоты и протекает в присутствии атмосферного кислорода.

Среда для теста на окисление - ферментацию (Hugh R., Leifson E., 1953).

Среда предназначена для установления путей расщепления углеводов бактериями (OF-тест), что характеризует определенные семейства; у энтеробактерий расщепление углеводов происходит ферментацией, у псевдомонад — окислением. Кроме того, существуют бактерии, у которых метаболизм углеводов полностью отсутствует.

Состав:

Пептон — 2 г

Натрий хлорид — 5 г

Калий гидрофосфат (K_2HPO_4) — 0,3 г

Агар — 3 г

Бромтимоловый синий (1% водный раствор) - 3 мл

Глюкоза — 10 г

Вода дистиллированная — 1000 мл

Приготовление: среда требует особо тщательного приготовления (аккуратного взвешивания, употребления хорошо проверенных ингредиентов и т. п.). Все вещества, входящие в состав среды, растворяют при подогревании в водяной бане, фильтруют, разливают в пробирки по 5 - 6 мл и стерилизуют при 118 °С 10 мин. Готовая среда имеет рН 7,1 - 7,2. Допустимо хранение при 4 °С 2 - 3 дня.

Для постановки OF-теста испытуемую культуру засевают уколом в столбик среды в двух пробирках, в одну из которых затем поверх среды наслаивают стерильное вазелиновое масло (0,5 - 1 мл). Другой вариант – посев петлей в глубокий столбик среды. Посевы проводят иглой (или маленькой петлей), не доводя ее до дна пробирки на 5 - 6 мм, инкубируют при 37 °С в течение 1 - 4 сут. Так как в среду в числе других компонентов входит агар в небольшой концентрации (что создает полужидкую консистенцию среды) и индикатор рН - бромтимоловый синий (придающий среде зеленовато-оливковый цвет), при учете реакции могут быть определены не только окисление или ферментация углевода (глюкозы), но также газообразование и подвижность. Изменение цвета среды в обеих пробирках (или в обеих частях в высоком столбике) на желтый свидетельствует о расщеплении глюкозы ферментацией (F), изменение аналогичного характера только в открытой пробирке (не залитой вазелиновым маслом, или в верхней части высокого столбика) - об окислительном процессе (O), а сохранение неизменного цвета в обеих пробирках - об отсутствии какого-либо метаболизма глюкозы (—).

Важными тестами, отличающими энтеробактерии от ряда других бактерий, являются также определение цитохромоксидазы и способности

восстанавливать нитраты в нитриты, свидетельствующей о присутствии у них нитратредуктазы.

Цитохромы - железосодержащие гемопротеиды, которые в завершающем этапе аэробного дыхания доставляют кислороду электроны (водород) с последующим образованием воды (H₂O). Из числа цитохромов в составе некоторых грамотрицательных бактерий содержится цитохром С. Благодаря ферменту оксидазе, свойственной аэробным или факультативно анаэробным микроорганизмам, происходит окисление цитохрома С, который способен использовать некоторые красители в качестве искусственных акцепторов водорода, обуславливая их переход в окрашенное состояние.

Классический метод определения наличия цитохромоксидазы связан с именем Эрлиха и воспроизведен им на животных в 1885 г. Для выявления этого фермента у микроорганизмов на поверхность 18 - 20-часовой агаровой культуры наносят каплю 1 % водного раствора пара-диметилфенилендиамина и добавляют каплю 1 % спиртового раствора альфа-нафтола. При положительной реакции через 1 - 3 мин появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенола синего.

Классический метод выявления цитохромоксидазы подвергался модификациям. Одной из них является широко применяемый за рубежом метод Ковача, предусматривающий использование одного реактива – 1 % водного раствора пара-тетраметил-фенилендиамина, который наносят на культуру (несколько капель). При положительной реакции через 20 - 30 с появляется темно-красное окрашивание, обусловленное переходом упомянутого реактива под воздействием окисленного цитохрома С в вурстеровский синий.

Механизмы реакций в тестах на цитохромоксидазу по методам Эрлиха и Ковача различны, поэтому их результат у некоторых микроорганизмов бывает неодинаков. Так, в числе грам-отрицательных микроорганизмов, от которых иногда необходимо дифференцировать энтеробактерии, один из видов *Flavobacterium* – *F. meningosepticum* в тесте по Эрлиху дает отрицательную реакцию, а в тесте по Ковачу — положительную. Лишь за этим исключением у

Таблица 12 - Дифференциация энтеробактерий от некоторых других грамотрицательных микроорганизмов

Микроорганизмы	Морфология	OF-тест	Цитохромок	говРедукция
Enterobacteriaceae	Небольшие полиморфные палочки; подвижные (перитрихи) или неподвижные; без капсулы или с капсулами	F	—	+
Pseudomonas	Прямые или изогнутые одиночные палочки; подвижные (моно- или лофотрихи); без капсул, часто образующие пигмент синего, зеленого, фиолетового и др. цвета	O	+	X

Vibrio	Короткие изогнутые или прямые палочки; одиночные или S-образующие нити, спирали; подвижные (монотрихи); без	F	+	+
Aeromonas	Прямые палочки с закругленными концами или кокковидные; располагаются поодиночке, парами, цепочками; подвижные (монотрихи) или неподвижные	F	+	+
Plesiomonas	Прямые палочки, располагаются поодиночке, парно или цепочками; подвижные (лофотрихи)	F	+	+
Flavobacterium	Тонкие палочки или кокковидные формы; подвижные (перитрихи) или неподвижные*	O или -, F	+**	X
Moraxella	Однородные или полиморфные, короткие толстые палочки, часто кокковидные; неподвижные	—	+	X
Alcaligenes	Одиночные палочки, кокковые или кокковидные формы; подвижные (пе-	—	+	X
Acinetobacter	Короткие толстые палочки или кокковидные формы; парно или цепочками; неподвижные; без капсулы или с капсулами	O, —	—	—***
<p>Условные обозначения: O – окисление, F – ферментация, – - отсутствие активности, X – различные результаты; * - при росте на твердых средах образуют колонии желтого, оранжевого, красного или коричневого цвета, оттенок пигмента зависит от состава среды и температуры культивирования, ** - кроме <i>F. meningosepticum</i>, *** - кроме единичных штаммов <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>.</p>				

всех, приведенных в таблице 12, микроорганизмов, характер реакций в тестах на наличие цитохромоксидазы, определенных обоими методами, совпадает.

Часто применяется тест на каталазу, положительный у всех энтеробактерий, за исключением некоторых представителей рода *Yersinia*. Тест проводится следующим образом. На предметном стекле в небольшую каплю 6 % пероксида водорода помещают петлю с культурой, размешивают и наблюдают образование пузырьков кислорода. Они выявляются только у каталазоположительных микроорганизмов.

Методика выполнения работы.

1 Определите дифференциальные признаки испытуемой культуры и запишите результат в таблицу 13.

2 Ответьте, принадлежат ли исследуемые культуры к семейству *Enterobacteriaceae*, или нет и почему.

Таблица 13 - Признаки исследуемых культур, дифференциальные для энтеробактерий

№ культуры	Микроскопия (рисунок)	Тест с 3% КОН	ОФ-тест (с рисунком)	Цитохром-оксидаза	Каталаза
1					
2					
3					
4					

3.3 Физиолого-биохимические характеристики отдельных родов энтеробактерий

Цель работы – освоить практический навык идентификации исследуемой культуры сем. *Enterobacteriaceae* до уровня рода (ориентировочно).

Идентификация выделяемых в процессе бактериологического исследования культур, подозреваемых на принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae*, складывается из нескольких этапов. Этап первичной идентификации с использованием тех или иных комбинированных сред (Олькеницкого, Клигlera, ДУКС или некоторых других, применяемых за рубежом) позволяет определить 4 - 5 признаков, на основании которых однозначное решение об отнесении культуры к определенному роду невозможно. Результаты первичной идентификации лишь ориентируют в выборе наиболее рационального и обоснованного направления, по которому должна идти дальнейшая идентификация культуры. Выраженность родственных связей энтеробактерий как по биохимическим свойствам, так и в отношении антигенной структуры потребовала ревизии старых представлений о диагностической значимости отдельных свойств культур.

Как указывалось, чистые культуры подвергают дальнейшему изучению на комбинированных средах, позволяющих осуществлять их предварительную идентификацию по сочетанию ряда признаков, важных для определения семейства, родов или некоторых видов энтеробактерий. К числу таких сред в нашей стране относят коммерческую среду Клигlera, прототипом которой является зарубежная K1, а также агар Олькеницкого, двухслойную комплексную среду (ДУКС) и трехсахарный агар с солями железа.

Посев на указанные среды проводят вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем в толщу агарового столбика, а заканчивают по скошенному агару штрихом. Следует иметь в виду, что укол в толщу агарового столбика не должен достигать дна, с тем, чтобы не нарушились условия для сбраживания глюкозы в относительно анаэробных условиях. Посевы инкубируют при 37 °С до следующего дня, учитывать результаты необходимо не позднее чем через 18 - 24 ч.

Первоосновой многих комбинированных сред послужила среда Ресселя, предназначавшаяся для выявления образования кислоты и газа при ферментации глюкозы и лактозы. В 1917 г. I. Kligler модифицировал ее добавлением сульфатного железа и тиосульфата натрия с целью выявления

продукции сероводорода. Состав сред Клиглера и TSI аналогичны, за исключением содержания в последней еще и сахарозы. Агар Олькеницкого представляет собой вариант трехсахарного агара, в котором в качестве индикатора сероводорода использована соль Мора и включена мочевины.

В таблице 14 показаны реакции энтеробактерий на средах Олькеницкого и Клиглера. О ферментации лактозы (сахарозы) на этих средах судят по изменению цвета агара в скошенной части, а о ферментации глюкозы - в столбике, в котором при газообразовании появляются пузырьки (разрывы среды или ее отслоение от стенок пробирки). Образование сероводорода устанавливают по почернению среды ниже скошенной части агара, а при его интенсивной продукции наступает почернение всего столбика среды. В среде Олькеницкого при росте культуры, гидролизующей мочевины, происходит щелочение, вследствие чего вся среда приобретает ярко-красный цвет. При интенсивном образовании сероводорода в этой или в средах Клиглера и TSI, когда целиком вся среда чернеет, учет ферментации углеводов затруднителен. Однако следует помнить, что процесс образования сероводорода протекает в кислой среде, поэтому почернение столбика свидетельствует о расщеплении глюкозы, свойственном всем энтеробактериям. ДУКС, разработанная в 1978 г. Г. П. Калиной, лишена указанных недостатков. В ДУКС, как и в агаре Олькеницкого, можно определить ферментацию глюкозы, лактозы и сахарозы, образование сероводорода и наличие уреазы. Преимущество ДУКС обусловлено послойным расположением мочевины, субстратов для индикации сероводорода и углеводов, что не мешает учету ферментации последних. Уместно отметить, что определить образование сероводорода можно лишь с помощью упомянутых сред Клиглера, Олькеницкого, TSI, ДУКС.

Трехсахарный агар с мочевиной (Олькеницкий И. С., 1958).

Среда предназначена для дифференциации бактерий по их способности ферментировать глюкозу и лактозу, а также образовывать сероводород. Готовая среда бледно-розового цвета.

Принцип действия: при расщеплении сахаров образуется кислота, что улавливают с помощью индикатора (фенолового красного), окрашивающего среду в желтый цвет. В среде глюкоза имеется в малой концентрации (0,1 %). Поэтому в аэробных условиях (в скошенной части агара) бактерии, ферментирующие только глюкозу, утилизируют ее полностью в первые часы роста. К моменту учета реакции (18 - 24 ч) для своего питания они используют уже пептоны, имеющиеся в среде в качестве белковой питательной основы. При этом в скошенной части происходит образование аммиака и подщелачивание среды (красный цвет). В столбике же желтый цвет сохраняется, так как, хотя глюкоза также за этот срок ферментирована, кислые конечные продукты ее расщепления в анаэробных условиях еще сохраняются и поддерживают низкое значение pH. Получается желтый столбик и красный скоп.

Энтеробактерии, сбраживающие глюкозу и лактозу, вызывают подкисление среды во всей пробирке (желтый столбик и скошенная часть). Лактоза (1 %) входит в состав среды в концентрации, превышающей в 10 раз концентрацию глюкозы. Поэтому через 18 - 24 ч инкубации лактоза еще не исчерпана и в скошенной части (в аэробных условиях), вследствие чего кислая

реакция сохраняется как в столбике, так и в скошенной части агара. Однако позднее после 48 ч инкубации посева здесь также будет наблюдаться щелочение (покраснение скошенной части среды) за счет расщепления пептонов.

Если бактерии при ферментации углеводов как конечный продукт метаболизма образуют газ (H_2 , CO_2), появляются разрывы среды различных размеров или скопление газа на дне пробирки, приподнимающее весь столбик агара.

Для обнаружения сероводорода существует в среде другая индикаторная система.

Только некоторые энтеробактерии обладают энзимом — тиосульфатредуктазой, вследствие чего способны образовывать сероводород из неорганических соединений серы, что является дифференцирующим признаком. В агаре Клиглера и ему подобных средах реакция проходит в два этапа. Вначале в анаэробных условиях, в кислой среде под действием микробного энзима тиосульфат восстанавливается в сульфит с выделением значительного количества сероводорода, представляющего собой бесцветный газ. Затем необходим второй этап: для его обнаружения в среду в качестве индикатора введены соли железа (мало-чувствительный реагент), которые вступают в реакцию с сероводородом, образуя сульфид железа в виде нерастворимого осадка черного цвета. В результате при положительной реакции среда в столбике чернеет.

Присутствие в среде мочевины позволяет определять наличие у бактерий фермента уреазы. Расщепление мочевины завершается выделением аммиака (NH_3), щелочного соединения (pH 8,1), под действием которого вся среда или ее нижняя часть краснеет.

По реакциям на комбинированных средах, в частности по отсутствию ферментации лактозы, может быть проведена предварительная дифференциация шигелл и сальмонелл от других энтеробактерий, хотя среди последних имеются лактозоотрицательные варианты. Характерным для шигелл в отличие от сальмонелл является отсутствие газообразования в глюкозе (кроме некоторых биоваров *S. flexneri* 6), хотя анаэрогенные варианты возможны в каждой родовой группе. Также представители родов *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Erwinia* могут быть ориентировочно определены на этих средах по образованию сероводорода; представители родов *Proteus* и *Yersinia* — по гидролизу мочевины.

Таблица 14 - Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде

Реакции в среде Олькеницкого, Клиглера				Предполагаемые энтеробактерии***
сахароза* Лактоза и (или)	Глюкоза	Сероводород	Мочевина**	
-	К	-	-	Shigella, Escherichia, Hafnia, Serratia, Providencia inconstans, Yersinia enterocolitica, некоторые серовары сальмонелл
-	КГ	-	-	Некоторые биовары Shigella flexneri 6, Escherichia, Hafnia, Serratia, P. inconstans, Salmonella paratyphi A и некоторые серовары сальмонелл
-	К	+	-	Salmonella typhi и некоторые серовары сальмонелл
-	КГ	+	-	Salmonella, Citrobacter, Edwardsiella
+	К	-	-	Escherichia, Citrobacter или не энтеробактерии
+	КГ	-	-	Escherichia, Citrobacter, Serratia, Klebsiella, Enterobacter
+	КГ	+	-	Citrobacter
•	•	•	+	Proteus (кроме P. inconstans), Yersinia
•	Г	•	+	Proteus (кроме P. inconstans)
-	-	-	-	не энтеробактерии
+	-	-	-	не энтеробактерии
<p>Условные обозначения: К – кислота, КГ – кислота и газ, Г – газ, • - учет реакций затруднен, - - реакция отрицательная, + - реакция положительная. * при применении среды Олькеницкого, ** при использовании среды Клиглера мочевины определяют дополнительно, *** не включены сведения по роду <i>Erwinia</i>.</p>				

Методика выполнения работы.

Учтите в соответствии с таблицей 15 и зарисуйте результат роста исследуемых культур в пробирках на среде Олькеницкого, запишите результаты учета биохимических реакций в таблицу и отметьте вероятную родовую принадлежность исследуемых культур (таблица 16).

Запишите механизм дифференциально-диагностического действия среды Олькеницкого.

Таблица 15 - Изменение окраски в среде Олькеницкого или ДУКС при различных биохимических реакциях

Слой среды	Изменение окраски в среде	Ферментация		Образование сероводорода	Гидролиз мочевины
		Глюкозы	Лактозы (сахарозы)		
Нижний столбик	Черно-фиолетовый	—			—
	Темно-зеленый	+			—
	Зеленый	+			—
	Светло-зеленый	+			—
	Желтый	+			—
	Малиновый				+
	Лиловый				+
	Фиолетовый				+
Верхний столбик	Узкое черное кольцо			+	
	Широкое черное кольцо			++	
	Почернение всего столбика			+++	
	Отсутствие почернения или слегка серый оттенок			—	
Скошенная часть	Оранжевый с переходом в красный и малиновый		—		
	Желтый		+		

Таблица 16 - Родовые признаки исследуемых культур энтеробактерий

№ культуры	1	2	3	4
Рисунок				
Ферментация лактозы (сахарозы) (+; -; •)				
Ферментация глюкозы (К; КГ; -; •)				

Образование сероводорода (+; -; •)				
Гидролиз мочевины (+; -)				
Вероятная родовая принадлежность				

3.4 Идентификация представителей сем. *Enterobacteriaceae* до уровня вида

Цель работы – освоить практический навык идентификации исследуемых культур сем. *Enterobacteriaceae* до уровня вида.

COLtест

Идентификационные полоски COLtест (“LACHEMA”) предназначены для быстрой идентификации кишечной палочки, выделенной из клинического материала, пищевых продуктов, воды и т. д. Идентификация основана на определении бета-глюкуронидазной активности и образования индола. Результаты анализов учитываются через 4 часа инкубации в термостате.

Принцип метода: Полоски COLtест помещаются в суспензию тестируемого штамма микроорганизма, приготовленную на физиологическом растворе, и инкубируются при 37 °С. Продукты реакций высвобождаются в пробирках с суспензиями и учитываются после инкубации в термостате.

Фермент бета-глюкуронидаза расщепляет 4-метилумбеллиферил-бета-D-глюкуронид с высвобождением при этом 4-метилумбеллиферона, который дает голубую флуоресценцию при просмотре в ультрафиолетовых лучах.

Продукция индола из L-триптофана определяется появлением красного окрашивания после добавления специфического реагента на индол (p-диметиламинобензальдегид).

Методика проведения COLtеста.

Приготовьте 0,5-1 мл суспензии тестируемого микроорганизма в стерильном физиологическом растворе. Мутность суспензии должна соответствовать 3 номеру по шкале McFarland. Поместите 1 полоску COLtеста в пробирку с суспензией (бумажная зона полоски должна быть полностью погружена в суспензию). Инкубируйте пробирки при 37 °С. После 4-х часовой инкубации вначале учтите результаты бета-глюкуронидазной реакции (GLR) в темном месте под ультрафиолетовой лампой (длина волны 360 нм). При положительной реакции наблюдается голубая флуоресценция, запишите результат. Затем в пробирку с суспензией добавьте 4-5 капель реактива на индол (IND). При положительной реакции появляется красное окрашивание.

Таблица 17 - Интерпретация реакций

Реакция	GLR (флюоресценция)	IND (цветная реакция)
Положительная	голубая флюоресценция	красный, розовый цвет
Отрицательная	отсутствие флюоресценции	желтый, желтоватый цвет

Биохимические тест-системы

В общей биологической характеристике энтеробактерий особое место отводят ферментативным свойствам, так как именно они по признанию таксономистов служат первоочередной основой для дифференциации в пределах семейства *Enterobacteriaceae* (на роды, виды и др.). Эти свойства признаны наиболее генетически стабильными; каждому роду присущ в определенной мере собственный спектр биохимических признаков, а выявление их технически несложно и позволяет получить достаточно наглядные результаты. Надежность биохимической дифференциации родовых групп энтеробактерий основывается на использовании совокупности, т. е. набора тестов.

Подкомитет по *Enterobacteriaceae* Международного комитета систематической бактериологии рекомендует для специализированных учреждений (лабораторий) набор, включающий более 35 тестов. Неприемлемость такого набора для практических бактериологических лабораторий очевидна. Специалисты разных стран поставили цель найти тот минимум наиболее значимых дифференциально-диагностических тестов (минимальный дифференцирующий ряд), который обеспечивал бы достаточную для практических лабораторий достоверность результатов идентификации энтеробактерий.

Были предложены различные схемы, составленные по принципу алгоритмов, исходящие из первоначальной дифференциации культур на образующие и не образующие сероводород и индол, расщепляющие и не расщепляющие лактозу, что позволяло с учетом этих свойств определить более рациональный выбор тестов в ходе дальнейшего исследования.

В настоящее время разработана целая серия коммерческих тест-систем для видовой идентификации энтеробактерий. Они представляют собой планшеты с лиофилизированной средой, субстратом и индикатором, помещенными в лунки. При исследовании суспензия чистой культуры раскапывается в лунки, инкубируется в термостате в течение суток при 37 °С, а затем по совокупности биохимических свойств определяется вид бактерий.

Методика выполнения работы.

1 Определите принадлежность исследуемой культуры к *E. coli* с помощью COLI-теста и запишите результат в таблицу 18.

2 Зарисуйте результат COLI-теста и запишите его принцип.

3 Подготовьте суспензию исследуемой культуры и раскапайте ее в лунки

тест-системы.

4 Учтите результаты биохимических реакций в лунках после инкубации и запишите их в таблицу 19.

5 С помощью компьютерной программы определите принадлежность культур к одному или нескольким видам с указанием вероятности, в %.

Таблица 18 - COLI-тест

№ культуры	1	2	3	4
Флюоресценция (рисунок)				
Продукция индола (рисунок)				
Признаки (флюоресценция/индол) + / +; + / -; - / +; - / -				
Принадлежность к виду E. coli				

Таблица 19 - Видовые признаки исследуемых культур энтеробактерий

№ культуры	Биохимические свойства												Вид бактерий	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1														
2														
3														
4														

Описание компьютерной программы «Универсальная программа для видовой идентификации микроорганизмов» (сертификат № 2004610330 от 2 февраля 2004 г).

После запуска на экране появляется основная форма программы, в которой из нескольких групп микроорганизмов на основании предварительно проведенных исследований (морфологические, тинкториальные и др. свойства) необходимо выбрать одну группу, в данном случае «Энтеробактерии» для дальнейшей идентификации (рисунок 13).

После нажатия соответствующей кнопки на экране появляется форма ввода данных, представляющая из себя таблицу с перечнем таксономически значимых характеристик, используемых для видовой идентификации данной группы микроорганизмов (рисунок 14). При этом в ячейки, соответствующие отдельным биологическим характеристикам, использованным для идентификации исследуемого микроорганизма, вводятся результаты тестов: «+» – наличие признака; «-» - отсутствие признака. В случае, если какие-либо тесты не выполнялись или при их учете был получен нечеткий результат, соответствующие ячейки таблицы не заполняются. По окончании ввода значений признаков следует нажатие кнопки «Ввести данные», после чего становится активной кнопка «Расчет».

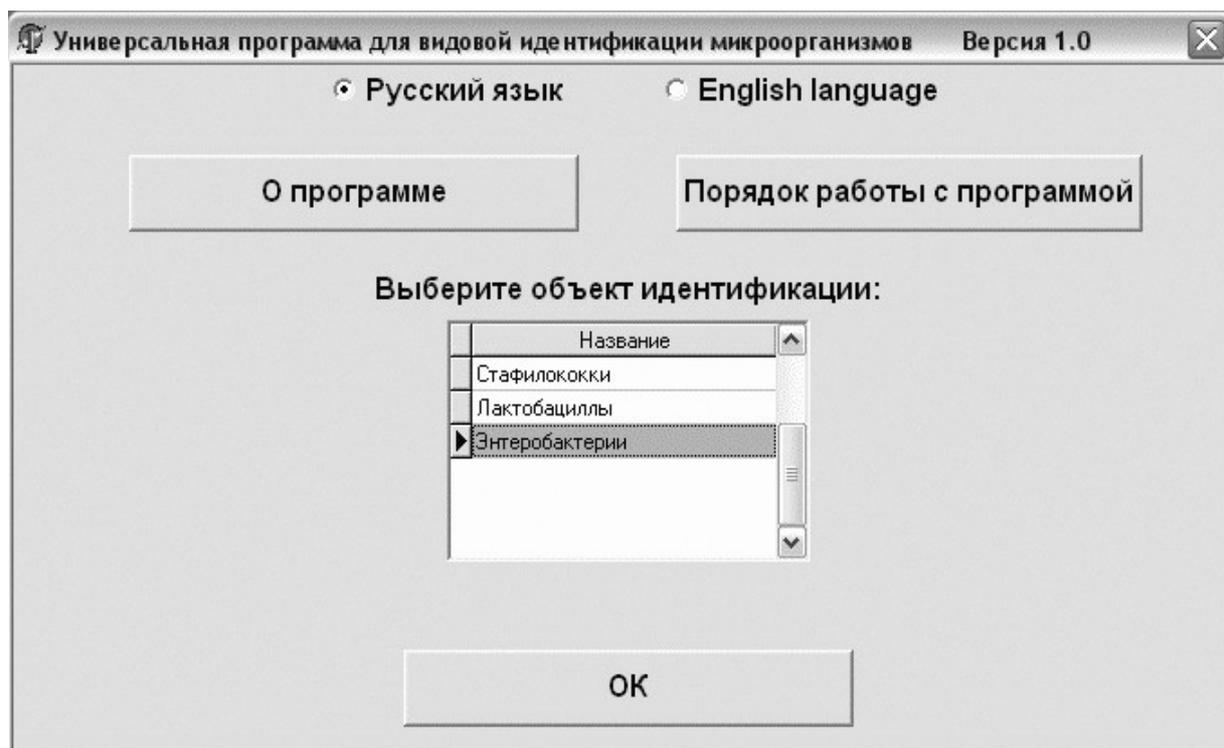


Рисунок 13 – Окно №1 компьютерной программы «Универсальная программа для видовой идентификации микроорганизмов»

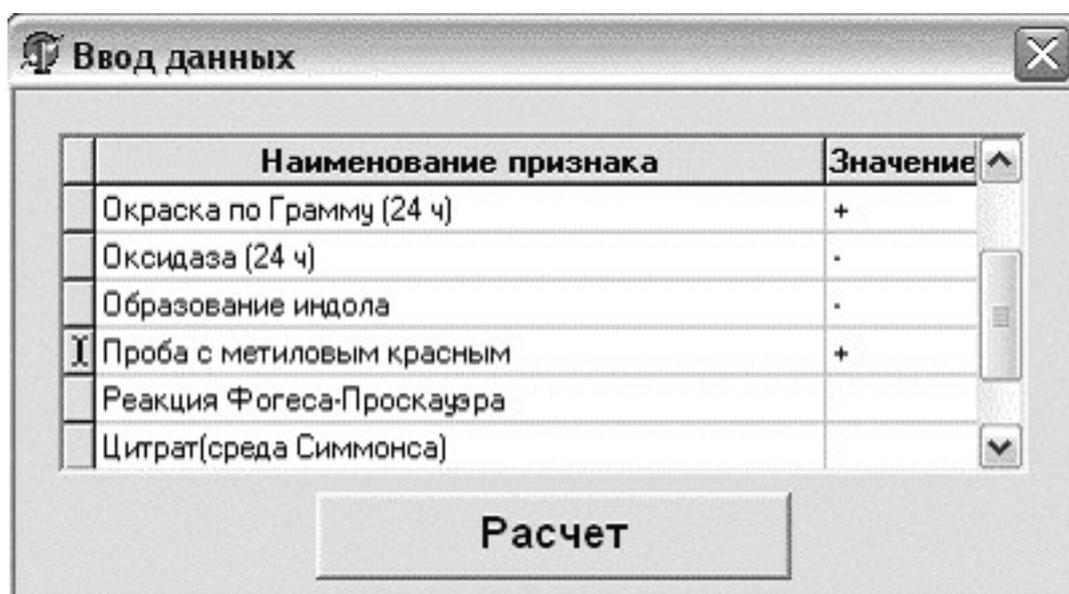


Рисунок 14 – Окно №2 компьютерной программы «Универсальная программа для видовой идентификации микроорганизмов»

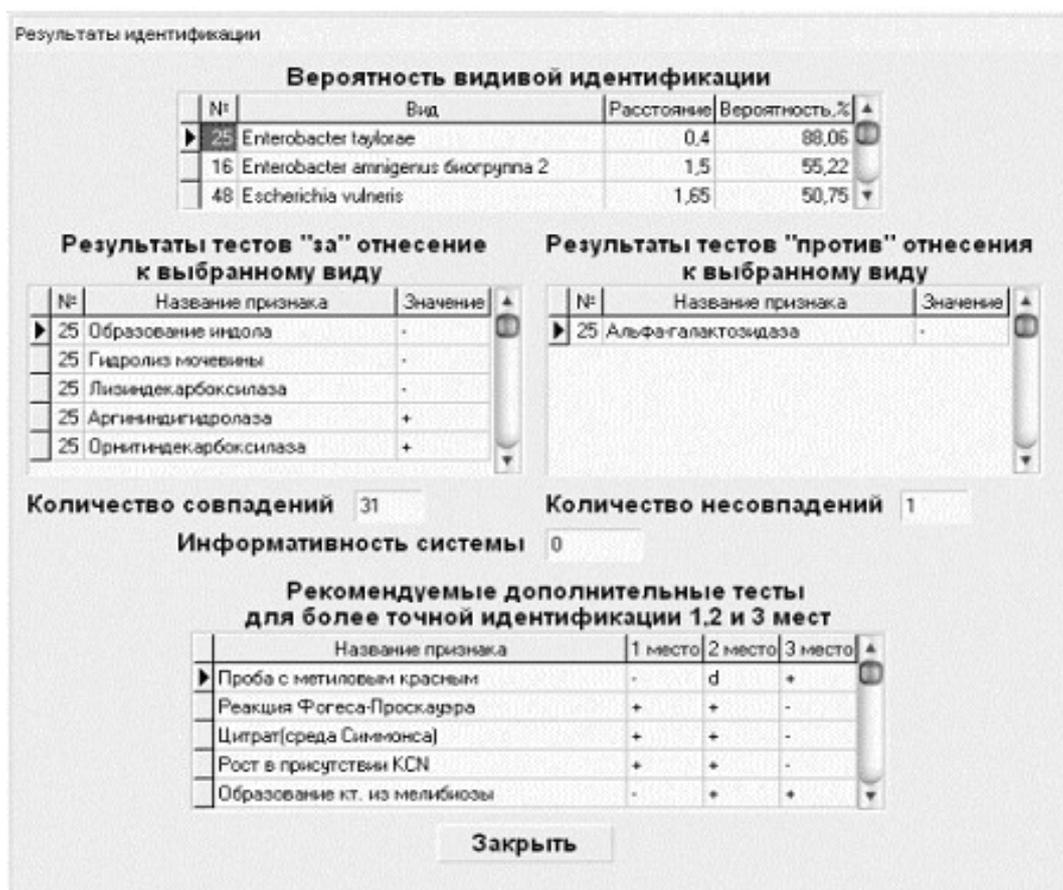


Рисунок 15 – Окно №3 компьютерной программы «Универсальная программа для видовой идентификации микроорганизмов»

4 Методы выделения, идентификации и дифференциации неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (НГОБ)

4.1 Физиолого-биохимические характеристики отдельных родов НГОБ

Цель работы – освоить практический навык идентификации исследуемой культуры НГОБ до уровня рода (ориентировочно).

При сомнении в принадлежности изучаемой культуры к семейству Enterobacteriaceae целесообразно применить следующие тесты, дифференцирующие семейства микроорганизмов: морфология (палочка, кокк) с окраской по Граму (+ или —), OF-тест, т. е. тип расщепления глюкозы - окисление (O) или ферментация (F), определение ферментов в тестах на цитохромоксидазу и нитратредуктазу (редукция нитратов в нитриты), оценка подвижности и образование пигментов.

Окраска по Граму

На основании тестов, указанных в таблице 20, приведены характеристики Enterobacteriaceae и некоторых микроорганизмов, не относящихся к этому семейству. Выяснение морфологии клеток и отношения к окраске по Граму у

сомнительных культур следует считать первоочередным, так как при этом исследовании могут быть выявлены характерные морфологические особенности (например, кокковая форма и др.), которые сразу же без других тестов дадут представление о микроорганизме.

Как считают, в большинстве случаев интерпретация результатов окраски мазка по Граму не представляет трудностей, однако некоторые грамположительные микроорганизмы, в частности представители рода *Bacillus*, могут иметь грамотрицательную окраску. Напротив, некоторые штаммы грамотрицательных родов *Acinetobacter* и *Moraxella* проявляют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, поэтому выглядят грамположительными.

Тест с КОН

Для уточнения таких «грам-сомнительных» реакций предложены особые методы. В Японии предложили метод, позволяющий отличить с помощью КОН-теста грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода с КОН лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроокиси калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

Постановка пробы с КОН предусматривает субсидирование петли суточной агаровой культуры в капле 3 % раствора КОН на предметном стекле. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петлей на 0,5 – 2,0 см и даже дальше. Учет этой пробы более удобен на черном фоне.

Образование слизистой консистенции после обработки грамотрицательных бактерий КОН обусловлено выходом из их клеток ДНК, являющейся вязким компонентом.

OF-тест

Определение типа расщепления глюкозы (OF-тест) проводят с помощью среды Хью — Лейфсона. В этой среде в качестве углевода использована глюкоза, ферментация которой характерна для представителей семейства *Enterobacteriaceae*, хотя могут быть применены и другие углеводы. При ферментативном процессе исходное расщепление глюкозы происходит в анаэробных условиях первичным фосфорилированием до образования соединения глюкоза-6-фосфат. Окислительный процесс расщепления глюкозы в отличие от этого начинается не с фосфорилирования, а с прямого окисления карбоксильной группы с образованием глюконовой кислоты и протекает в присутствии атмосферного кислорода.

Среда для теста на окисление - ферментацию [Hugh R., Leifson E., 1953]

Среда предназначена для установления путей расщепления углеводов бактериями (OF-тест), что характеризует определенные семейства; у энтеробактерий расщепление углеводов происходит ферментацией, у псевдомонад — окислением. Кроме того, существуют бактерии, у которых метаболизм углеводов полностью отсутствует.

Состав:

Пептон — 2 г

Натрий хлорид — 5 г

Калий гидрофосфат (K_2HPO_4) — 0,3 г

Агар — 3 г

Бромтимоловый синий (1 % водный раствор) - 3 мл

Глюкоза — 10 г

Вода дистиллированная — 1000 мл

Приготовление: среда требует особо тщательного приготовления (аккуратного взвешивания, употребления хорошо проверенных ингредиентов и т. п.). Все вещества, входящие в состав среды, растворяют при подогревании в водяной бане, фильтруют, разливают в пробирки по 5 - 6 мл и стерилизуют при 118 °С 10 мин. Готовая среда имеет рН 7,1 - 7,2.

Используют и другой способ приготовления: основу (все компоненты, кроме глюкозы) готовят, как сказано выше, затем разливают в пробирки мерно по 5 мл и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин. Глюкозу в виде 10 % водного раствора подвергают стерилизующей фильтрации и добавляют асептически по 0,5 мл в каждую пробирку со стерильной основой. После тщательного перемешивания среду можно использовать. Допустимо хранение при 4 °С 2-3 дня.

Для постановки OF-теста испытуемую культуру засевают уколом в столбик среды в двух пробирках, в одну из которых затем поверх среды наслаивают стерильное вазелиновое масло (0,5 - 1 мл). Другой вариант – посев петлей в глубокий столбик среды. Посевы проводят иглой (или маленькой петлей), не доводя ее до дна пробирки на 5-6 мм, инкубируют при 37 °С в течение 1-4 сут. Так как в среду в числе других компонентов входит агар в небольшой концентрации (что создает полужидкую консистенцию среды) и индикатор рН — бромтимоловый синий (придающий среде зеленовато-оливковый цвет), при учете реакции могут быть определены не только окисление или ферментация углевода (глюкозы), но также газообразование и подвижность. Изменение цвета среды в обеих пробирках (или в обеих частях в высоком столбике) на желтый свидетельствует о расщеплении глюкозы ферментацией (F), изменение аналогичного характера только в открытой пробирке (не залитой вазелиновым маслом, или в верхней части высокого столбика) - об окислительном процессе (O), а сохранение неизменного цвета в обеих пробирках - об отсутствии какого-либо метаболизма глюкозы (—).

Цитохромоксидаза

Цитохромы - железосодержащие гемопротеиды, которые в завершающем этапе аэробного дыхания доставляют кислороду электроны (водород) с последующим образованием воды (H_2O). Из числа цитохромов в составе некоторых грамотрицательных бактерий содержится цитохром С. Благодаря ферменту оксидазе, свойственной аэробным или факультативно анаэробным микроорганизмам, происходит окисление цитохрома С, который способен использовать некоторые красители в качестве искусственных акцепторов водорода, обуславливая их переход в окрашенное состояние.

Классический метод определения наличия цитохромоксидазы связан с

именем Эрлиха и воспроизведен им на животных в 1885 г. Для выявления этого фермента у микроорганизмов на поверхность 18 - 20-часовой агаровой культуры наносят каплю 1 % водного раствора пара-диметилфенилендиамина и добавляют каплю 1 % спиртового раствора альфа-нафтола. При положительной реакции через 1 - 3 мин появляется ярко-синее окрашивание, обусловленное образованием индофенола синего.

Классический метод выявления цитохромоксидазы подвергался модификациям. Одной из них является широко применяемый за рубежом метод Ковача, предусматривающий использование одного реактива – 1 % водного раствора пара-тетраметил-фенилендиамина, который наносят на культуру (несколько капель). При положительной реакции через 20-30 с появляется темно-красное окрашивание, обусловленное переходом упомянутого реактива под воздействием окисленного цитохрома С в вурстеровский синий.

Механизмы реакций в тестах на цитохромоксидазу по методам Эрлиха и Ковача различны, поэтому их результат у некоторых микроорганизмов бывает неодинаков. Так, в числе грам-отрицательных микроорганизмов, от которых иногда необходимо дифференцировать эитеробактерии, один из видов *Flavobacterium* – *F. meningosepticum* в тесте по Эрлиху дает отрицательную реакцию, а в тесте по Ковачу - положительную. Лишь за этим исключением у всех приведенных в таблице 10 микроорганизмов характер реакций в тестах на наличие цитохромоксидазы, определенных обоими методами, совпадает.

Определение подвижности

Подвижность служит важным признаком при классификации бактерий. Простейший метод определения подвижности - микроскопирование капли культуры (см. ниже). Если организм не проявляет подвижности, его следует высеять на среду для определения подвижности, чтобы установить, распространяются клетки в мягком агаре (подвижные) или остаются в месте инокуляции (неподвижные) (см. ниже «Среда для определения подвижности»).

Микроскопирование капли культуры. На чистом предметном стекле проводят специальным карандашом линию и рядом с ней наносят петлей каплю жидкой культуры. Фокусируют микроскоп на проведенной линии, используя объектив 10х, затем уменьшают освещенность диафрагмой конденсора и перемещают стекло, чтобы сфокусировать край капли.

Меняют объектив на 40х и микроскопируют объект. Клетки подвижных организмов перемещаются относительно друг друга. Вследствие броуновского движения бактерии хотя и довольно активно смещаются в результате бомбардировки молекулами, но относительно друг друга их расположение в поле зрения почти не меняется.

Среда для определения подвижности. Состав: агар-агар 3 г; мясо-пептонный бульон 1 л. (Конечная концентрация агара в среде - 0,3 %.) Среду нагревают для расплавления агара, разливают по 8 мл в пробирки (15 x 125 мм) и автоклавируют 15 мин при 121 °С. Инокулятом служит 18-24 - часовая культура на скошенном питательном агаре. Посев производят проколом в центр пробирки на глубину столбика или на 5 мм. Культуры инкубируют при 35 °С (или при 25 °С, если при 35 °С организм не проявляет подвижности) и

проверяют до 7 сут. Подвижные организмы распространяются по среде вокруг места посева. Неподвижные остаются в области прокола.

Тест на образование пигментов псевдомонадами

Этот тест применяется в связи с тем, что большинство псевдомонад не образует пигментов на обычно используемых лабораторных средах.

В работах Э. Кинг и ее сотрудников установлено, что на образование пигментов сильно влияет вид пептона, применяемого в основной среде. Разработаны две простые среды, усиливающие пигментообразование: среда А ("Tech") для стимуляции синтеза пиоцианина и пиорубина и среда В ("F10"), стимулирующая образование пиовердина (флуоресцеина).

Среда А ("Tech"): пептон 20 г; глицерин 10 мл; хлористый магний 1,4 г; сернокислый калий 10 г; агар 15 г; дистиллированная вода 1 л.

Среда В ("F10"): пептон 20 г; глицерин 10 мл; фосфорнокислый калий двузамещенный безводный 1,5 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 г; агар 15 г; дистиллированная вода 1 л. В каждой среде рН доводят до 7,2. Среды разливают по 7 мл в пробирки (15 x 125 мм) и автоклавируют 15 мин при 121 °С. Пробирки охлаждают в скошенном положении.

Скошенный агар засевают петлей 24-часовой культуры, выращенной в жидкой среде с экстрактом сердечной мышцы, и инкубируют при 35 °С до 7 сут. Образование пигментов обычно становится заметным в первые 3 сут.

Цвет пигмента у пиоцианин-образующих культур варьирует от бледно-голубого до темно-синего или зеленого на среде А ("Tech") и ярко-зеленого на среде В ("F10"). Единственный известный вид бактерий, синтезирующих пиоцианин, — это *Pseudomonas aeruginosa*. Пиоцианин растворим в хлороформе и меняет цвет от голубого в щелочной среде до розового в кислой. Чтобы подтвердить наличие пиоцианина, к культуре на скошенном агаре добавляют 1-2 мл хлороформа и перемешивают агар для экстрагирования пигмента. Слой хлороформа при наличии пиоцианина становится синим.

Небольшое количество синего хлороформного слоя переносят пипеткой в чистую пробирку и добавляют 1-2 капли 1 N HCl. При этом пиоцианин становится розовым. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: хлороформ может оказывать канцерогенное действие.

Цвет пиорубин-образующих культур варьирует на среде А ("Tech") от розового до темно-каштанового. У пиовердин-образующих культур на среде В ("F10") пигмент флуоресцирует в ультрафиолетовом свете (при освещении лампой Вуда в темноте). Образованию пиовердина часто способствует инкубация при 25 °С. Некоторые культуры *Pseudomonas aeruginosa* на среде В ("F10") образуют темно-коричневый пигмент.

Таблица 20 - Дифференциация НГОБ и других грамотрицательных бактерий

Название бактерий	Морфология	ОФ-тест	Цитохромок-сидаза
Enterobacteriaceae	Небольшие полиморфные палочки; подвижные (перитрихи) или неподвижные; без капсулы или с капсулами	F	-
Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas	Короткие изогнутые или прямые палочки; одиночные или S-образующие нити, спирали; подвижные (монотрихи или лофотрихи) или неподвижные; без капсул	F	+
Pseudomonas	Прямые или изогнутые одиночные палочки; подвижные (моно- или лофотрихи); без капсул, часто образующие пигмент синего, зеленого, фиолетового и др. цвета	O (-)	+
Flavobacterium	Тонкие палочки или кокковидные формы; неподвижные, реже подвижные (перитрихи) *	O (-); F	+**
Moraxella	Однородные или полиморфные, короткие толстые палочки, часто кокковидные; неподвижные	-	+
Alcaligenes	Одиночные палочки, кокковые или кокковидные формы; подвижные (перитрихи)	-	+
Acinetobacter	Короткие толстые палочки или кокковидные формы; парно или цепочками; неподвижные; без капсулы или с капсулами	O (-)	-
<p>Условные обозначения: O - окисление, F - ферментация; — - отсутствие активности.</p> <p>* При росте на твердых питательных средах образуют колонии желтого, оранжевого, красного или коричневого цвета, оттенок пигмента зависит от состава среды и температуры культивирования.</p> <p>** Кроме <i>F. meningosepticum</i></p> <p>*** Кроме единичных штаммов <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>.</p>			

Методика выполнения работы.

1 Определите дифференциальные признаки испытуемой культуры и запишите результат в таблицу 21.

2 По таблице 20 определите, к какому роду предположительно принадлежат исследуемые культуры, и почему.

5 Литература, рекомендуемая для изучения темы

- 1 **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: ИКЦ «Академия», 2003. – 464 с. - ISBN 5-7695-1403-5
- 2 **Нетрусов, А.И.** Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: ИКЦ «Академия», 2005. – 608 с. – ISBN 5-7695-1809-Х
- 3 **Нетрусов, А.И.** Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: ИКЦ «Академия», 2005. – 608 с. – ISBN 5-7695-1809-Х
- 4 **Определитель бактерий Берджи.** В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса; пер. с англ. – М.: Мир, 1997. Т 1, 2. – 800 с.
- 5 **Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных)** / Р. Вейант [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1999. – 791 с.
- 6 **Пивоваров, Ю.П.** Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация) / Ю.П. Пивоваров, В.В. Королик. - М.: ИКАР, 2000. - 268 с. – ISBN 5-7974-0029-4
- 7 **Современная микробиология. Прокариоты:** в 2-х т. / под ред. И. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля; пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – Т.1. – 656 с. – ISBN 5-03-003707-1
- 8 **Современная микробиология. Прокариоты:** в 2-х т. / под ред. И. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля; пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – Т.2. – 496 с. – ISBN 5-03-003706-3
- 9 **Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования** / М.О. Биргер [и др.]; под ред. М.О. Биргера. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
- 10 **Энтеробактерии: (Руководство для врачей)** / И.В. Голубева [и др.]; под ред. В.И. Покровского. – М.: Медицина, 1985. – 321 с.

Список использованных источников

- 1 Большой практикум по микробиологии / Т.В. Аристовская [и др.]; под ред. Г.Л. Селибера. – М.: Высшая школа, 1962. – 491 с.
- 2 **Нетрусов, А.И.** Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: ИКЦ «Академия», 2005. – 608 с. – ISBN 5-7695-1809-X
- 3 Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных) / Р. Вейант [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1999. – 791 с.
- 4 **Петерсон, А.М.** Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам / А.М. Петерсон, П.А. Чиров. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 24 с. - ISBN 5-292-03428-2
- 5 Энтеробактерии: (Руководство для врачей) / И.В. Голубева [и др.]; под ред. В.И. Покровского. – М.: Медицина, 1985. – 321 с.

Приложение А

(справочное)

Вопросы к экзамену по дисциплине «Частная микробиология и систематика микроорганизмов»

- 1 Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней.
- 2 Ламинарные боксы, степени защиты. Правила работы в ламинарном боксе.
- 3 Подготовка микробиологической лаборатории к работе, обработка помещений лаборатории.
- 4 Ведение лабораторных записей.
- 5 Правила работы с культурами микроорганизмов.
- 6 Приготовление микропрепаратов живых и фиксированных, окраска препаратов.
- 7 Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Компоненты питательных сред.
- 8 Классификация питательных сред.
- 9 Приготовление и стерилизация питательных сред.
- 10 Автоклавирование, тиндализация, пастеризация.
- 11 Стерилизация фильтрованием, облучением, газовая стерилизация.
- 12 Условия культивирования микроорганизмов.
- 13 Активная кислотность среды, аэрация. Культивирование аэробных микроорганизмов. Определение сульфитного числа. Устройство ферментера.
- 14 Принципы культивирования строгих анаэробов по Р. Хангейту.
- 15 Роль температуры, влажности и освещенности при культивировании микроорганизмов.
- 16 Режимы культивирования микроорганизмов.
- 17 Способы хранения микроорганизмов.
- 18 Получение накопительных культур.
- 19 Методы выделения чистых культур.
- 20 Оценка чистоты выделенной культуры.
- 21 История систематики бактерий. История описания и систематики актиномицетов, миксобактерий и светящихся бактерий.
- 22 Формирование систематики микроорганизмов. Роль А.В. Левенгука, О.Ф. Мюллера, Х. Эренберга, М. Перти, К. Негели, Ф. Кона.
- 23 Совершенствование систематики микроорганизмов. Роль К.Б. Леман и Р. Неймана, В. Мигулы, С.Н. Виноградского и М. Бейеринка, С. Орла-Йенсена, А. Клюйвера, К. ван Ниля и Р. Стениера.
- 24 Взаимосвязь между описанием, классификацией и номенклатурой в таксономии прокариот.
- 25 Три аспекта современной таксономии.
- 26 Понятия генома и фенома.

- 27 Устаревшие и современные системы классификации прокариот. Фенетика и кладистика. Филогенетическая классификация.
- 28 Понятия гомология, аналогия, гомоплазия. Конвергенция и дивергенция.
- 29 Использование биологических молекул в классификации и систематике. Первичные, вторичные и третичные семантиды, эписемантические и асемантические молекулы.
- 30 Общие принципы номенклатуры. Латинские название таксонов.
- 31 Бинарная номенклатура. Стандартные окончания таксонов.
- 32 Типовые штаммы микроорганизмов. Микробиологические коллекции.
- 33 Международный кодекс номенклатуры бактерий. Эффективные таксономические публикации. Описание новых таксонов.
- 34 Адансоновские принципы нумерической таксономии.
- 35 Этапы нумерической таксономии.
- 36 Принципы количественного измерения сходства.
- 37 Алгоритмы группирования штаммов на основе величин сходства.
- 38 Иерархические и неиерархические методы кластеризации. Кластерный анализ.
- 39 Дендрограммы. Определение таксономического ранга. Метод главных компонент. Многомерное шкалирование.
- 40 Анализ химических признаков клеток как инструмент таксономии. Хемотаксономические маркеры.
- 41 Компоненты клеточной стенки: пептидогликан, тейхоевые кислоты, липополисахариды, белки и гликопротеины. Гетерополисахариды архей.
- 42 Таксономические маркеры наружной мембраны – липополисахарид и его компоненты. Миколовые кислоты.
- 43 Таксономические маркеры плазматической мембраны – каротиноиды, фосфолипиды, гликолипиды, аминокислоты, жирные кислоты и гидроксикислоты, длинноцепочечные диолы, сфинголипиды и гопаноиды. Бактериохлорофиллы.
- 44 Химический фингерпринтинг. Методы фингерпринтинга: белковые профили, спектрофотометрические методы, масс-спектрометрия продуктов гидролиза.
- 45 Методы определения геномных признаков. Рестрикционный анализ нуклеиновых кислот с использованием бактериальных рестрицирующих эндонуклеаз (BRENDA).
- 46 Определение полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, ПДРФ.
- 47 Риботипирование.
- 48 Анализ профилей низкомолекулярных РНК.
- 49 Рестрикционный анализ амплифицированной рибосомной РНК (ARDRA).
- 50 Амплификация со случайными праймерами (RAPD).
- 51 Гибридизация с олигонуклеотидными зондами; анализ плазмидных профилей и плазмидный фингерпринтинг; анализ белкового состава клеток методами одномерного и двумерного электрофореза.
- 52 Количественные характеристики ДНК.

- 53 Методы определения нуклеотидного состава. Использование %ГЦ в систематике.
- 54 Определение гомологии ДНК. Использование меченых зондов. Методы гибридизации ДНК и их характеристика.
- 55 Основной принцип ПЦР.
- 56 Этапы ПЦР.
- 57 Методы молекулярного типирования микроорганизмов на основе ПЦР.
- 58 Преимущества и недостатки метода ПЦР.
- 59 Секвенирование ДНК и его использование в систематике.
- 60 Молекулярная филогения. «Молекулярные часы». Генетические банки.
- 61 Понятие филогенетического маркера и требования к нему.
- 62 Алгоритмы построения филогенетических деревьев. Проверка достоверности топологии филогенетического дерева.
- 63 Гипотезы конверсии и сегрегации.
- 64 Основные различия между эукариотами и двумя доменами прокариот (Bacteria и Archaea) на молекулярном уровне.
- 65 Характеристика доменов. Отличительные характеристики архей.
- 66 Характеристика основных филумов (типов) бактерий и архей в соответствии с «Руководством Берджи по систематике бактерий» 2001 г.
- 67 Названия филумов бактерий, представленность подчиненных таксонов, основные морфологические, физиологические и генетические особенности.
- 68 Таксономия, номенклатура и классификация сем. Enterobacteriaceae.
- 69 Культуральные особенности энтеробактерий различных родов. Питательные среды для энтеробактерий.
- 70 Определение физиологических и биохимических свойств энтеробактерий.
- 71 Предварительная родовая дифференциация на комбинированных средах типа Олькеницкого.
- 72 Методы видовой идентификации энтеробактерий.
- 73 Медицинское, ветеринарное значение энтеробактерий и их распространение.
- 74 Таксономия, номенклатура и классификация представителей ферментирующих глюкозу оксидазоположительных бактерий сем. Vibrionaceae и родственных таксонов.
- 75 Таксономия, номенклатура и классификация представителей неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (НГОБ) сем. Pseudomonadaceae.
- 76 Культуральные особенности бактерий различных родов. Характеристика родов Aeromonas, Vibrio, Plesiomonas, Photobacterium, Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligenes, Flavobacterium, Moraxella и др. Питательные среды для НГОБ и вибрионов.
- 77 Определение физиологических и биохимических свойств НГОБ и вибрионов.
- 78 Методы видовой идентификации НГОБ и вибрионов.

- 79 Медицинское, ветеринарное значение НГОБ и вибрионов и их распространение.
- 80 Выявление *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды.
- 81 Таксономия, номенклатура и классификация фирмакутных бактерий.
- 82 Спорообразующие и неспорообразующие аэробные и факультативно-анаэробные кокки. Культуральные особенности бактерий различных родов.
- 83 Характеристика родов *Sporosarcina*, *Deinococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и др. Питательные среды для этих бактерий. Определение физиологических и биохимических свойств. Родовая дифференциация.
- 84 Методы видовой идентификации. Медицинское, ветеринарное значение грамположительных кокков, их применение и распространение.
- 85 Спорообразующие и неспорообразующие аэробные и факультативно-анаэробные палочки. Таксономия и номенклатура.
- 86 Культуральные особенности бактерий различных родов. Характеристика родов *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Actinomyces*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Gardnerella*, *Propionibacterium* и др. Питательные среды для бактериальных грамположительных палочек.
- 87 Определение физиологических и биохимических свойств грамположительных палочек. Методы видовой идентификации.
- 88 Медицинское, ветеринарное значение грамположительных палочек, их применение и распространение.
- 89 Таксономия порядка *Actinomycetales*. Характеристика морфологии актиномицетов. Типы мицелия.
- 90 Принципы культивирования и изучения актиномицетов. Особенности культивирования.
- 91 Принципы родовой идентификации актиномицетов. Типы спорообразования. Хемотаксономические особенности.
- 92 Таксономия и филогения домена *Archaea*. Морфо-физиологические особенности архей.
- 93 Принципы культивирования и изучения архей. Особенности культивирования архей различных групп.
- 94 Принципы идентификации архей. Морфологические и физиологические особенности разных групп архей. Краткая характеристика групп и основных родов по руководству Берджи.
- 95 Сульфатредуцирующие археи, галобактерии, археи без клеточной стенки и экстремальные термофилы. Применение и распространение архей.