

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

И. Б. Ившина, Т. Н. Каменских, Е. А. Тюмина, А. А. Елькин

МИКРОБИОЛОГИЯ

**Рабочая тетрадь
для лабораторно-практических занятий**

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве
практикума для студентов, обучающихся
по направлениям подготовки бакалавров и магистров
«Биология»*



Пермь 2022

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
И17

Ившина И. Б.

И17 Микробиология. Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий : практикум / И. Б. Ившина, Т. Н. Каменских, Е. А. Тюмина, А. А. Елькин ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь, 2022. – 100 с.

ISBN 978-5-7944-3859-8

Пособие включает 15 практических занятий, отражающих базовые темы учебной дисциплины, а также список рекомендованной специальной литературы. В структуру каждого задания включены методические указания к выполнению лабораторно-практических работ и контрольные вопросы для оценки степени теоретической и практической подготовленности студентов к занятию. В каждой лабораторной работе кратко обоснована цель исследования, описаны техника и методика постановки опыта, дан перечень необходимых материалов и оборудования для проведения эксперимента. Изложение методов дополнено сводными таблицами, схемами и рисунками, необходимыми для выполнения заданий и позволяющими легко ориентироваться в материале. В задачах лабораторного практикума применяются наборы штаммов бактерий, предоставляемые безвозмездно для образовательных целей Региональной профилированной коллекцией алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc01.ru>). Пособие направлено на приобретение студентами навыков экспериментальной работы, использования измерительных приборов и лабораторного аналитического оборудования, критической оценки и интерпретации полученных результатов, а также составления исследовательского отчета.

Рабочая тетрадь предназначена для самостоятельной практической работы студентов вузов и будет полезна биологам и специалистам смежных областей.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

*Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Рецензенты: кафедра микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е. А. Вагнера (зав. кафедрой – д-р мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ **Э. С. Горовиц**);

д-р биол. наук, проф., академик АН РТ, зав. каф. микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета **О. Н. Ильинская**

ISBN 978-5-7944-3859-8

© ПГНИУ, 2022
© Ившина И. Б., Каменских Т. Н.,
Тюмина Е. А., Елькин А. А., 2022

Содержание

Предисловие	5
Правила и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории	6
Занятие 1. Правила работы в микробиологической лаборатории. Составление сред и методы стерилизации	7
Занятие 2. Выделение и количественный учет микроорганизмов высевом на плотные питательные среды	12
Занятие 3. Выделение чистых культур микроорганизмов	18
Занятие 4. Устройство светлопольного микроскопа и правила работы с ним	27
Занятие 5. Приготовление препаратов микроорганизмов. Выявление клеточных структур	31
Занятие 6. Измерение размеров микроскопических объектов	37
Занятие 7. Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов. Определение способности бактерий использовать углеводы, спирты и органические кислоты	40
Занятие 8. Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов. Определение способности актинобактерий использовать углеводороды.....	49
Занятие 9. Хемотаксономические признаки микроорганизмов. Установление типа свободных миколовых кислот у корине- и нокардиоформных актинобактерий	52
Занятие 10. Определение чувствительности бактерий к антибиотическим веществам диско-диффузионным методом	57
Занятие 11. Методы консервации живых культур микроорганизмов	61
Занятие 12. Учет микрофлоры в воздухе закрытых помещений	65
Занятие 13. Подсчет клеток под микроскопом в камере Горяева	67
Занятие 14. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов	70
Занятие 15. Люминесцентный метод количественного определения клеток микроорганизмов	75
Рекомендуемая литература	78
Приложение 1. Иллюстрация материалов лабораторных работ	79
Приложение 2. Способ получения культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов	91

Приложение 3. Наборы коллекционных бактериальных культур для обеспечения занятий	93
Приложение 4. Правила работы с пипетками (дозаторами) переменного объема	95
Приложение 5. Средства для мытья лабораторной посуды	96
Приложение 6. Средства для обработки рабочего стола	96
Приложение 7. Обработка предметных стекол	96
Приложение 8. Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе.....	97

Предисловие

Чем больше проникаем мы в сущность вековой работы микроорганизмов, тем больше убеждаемся, что жизнь нашей планеты неразрывно связана с их деятельностью, без которой всё замерло бы и в мировом пространстве носилась бы безжизненная Земля.

Б. Л. Исаченко
Избранные труды. М.: 1951

Уважаемые студенты, вы решили посвятить себя глубокому изучению микробиологии – одной из перспективных наук современности, предметом познания которой являются бесконечно малые многочисленные вездесущие микроорганизмы. Влияние их на нашу жизнь незримо, огромно, взаимозависимо и неоднозначно. Эти мельчайшие, преимущественно одноклеточные, организмы не видны невооруженным глазом. Заглянем в микроскоп (*микроскопируем*). Однако сначала вырастим клетки (*культивируем*), потом размножим (*посеем*), выделим (*расеем*), узнаем, как устроены (*изучим*) и выясним их научную родословную (*идентифицируем*). Такова программа последовательных действий исполнителя, приводящая к поставленной цели и заданному результату за определенное число шагов.

Каждое лабораторное занятие с использованием рабочей тетради состоит из трех частей: вводной, практической и заключительной. *Введение* содержит минимальный уровень теоретических знаний, достаточный для проведения экспериментов, но не освобождающий от изучения обязательной и дополнительной учебной литературы. *Практическая часть* включает пошаговые инструкции для проведения лабораторных работ, дополненные поясняющими рисунками и схемами. Рабочая тетрадь содержит перечень микробных культур, материалов, химических реагентов и оборудования, необходимых для проведения конкретного лабораторного эксперимента. Особо важным является раздел «*Наблюдения и результаты*», в котором исполнителем должны быть описаны результаты самостоятельных наблюдений, исполнены лаконичные учебные зарисовки, произведены математические расчеты и созданы сводные таблицы с исходными данными. *Заключение* представляет собой часть работы, где необходимо сформулировать обоснованные выводы по результатам проведенных исследований. Каждое практическое занятие сопровождается перечнем *контрольных вопросов* для самопроверки знаний по теме занятия. Проведение практических занятий способствует приобретению студентами навыков экспериментальной работы и использования лабораторного аналитического оборудования, а также развитию критического мышления и оценочной интерпретации полученной информации.

Неотъемлемая часть настоящего учебного пособия – восемь *приложений*. В них приведены макро- и микрофотографические изображения микробных культур, а также наглядные примеры реализации отдельных методов исследования, необходимых для успешного выполнения практических работ и более ясного понимания изложенных в основной части пособия вопросов. В качестве объектов исследования будут предоставлены наборы чистых идентифицированных бактериальных культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc01.ru>), информация о которых приведена в *прилож. 2 и 3*.

Рабочая тетрадь составлена в соответствии с действующей учебной программой по основным разделам общей микробиологии и включает методики, которые активно применяются в практике профессиональной деятельности микробиологов. Пособие предназначено для самостоятельной практической работы студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология» (профиль «Микробиология»).

Правила и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Работа в лаборатории ведется только в халатах и сменной обуви или бахилах. Волосы должны быть подобраны или убраны под шапочку. При работе с микроорганизмами и агрессивными химическими реагентами необходимо использовать перчатки и защитные очки.
2. В лаборатории запрещается принимать пищу и пить воду. Не допускаются излишние разговоры и хождение.
3. Студентам запрещается работать в отсутствие преподавателя, а также в неустановленное время без разрешения преподавателя.
4. К выполнению каждой лабораторной работы приступать только после ознакомления с методикой и правилами ее безопасного выполнения.
5. Соблюдать осторожность при работе с открытым огнем и спиртовыми растворами.
6. Рабочее место следует поддерживать в чистоте. Во время работы с горелкой на лабораторном столе не должно быть предметов, не имеющих отношения к работе.
7. Все использованные предметы должны быть обеззаражены либо сжиганием в пламени горелки, либо погружением в дезинфицирующий раствор (стекла, шпатели, пипетки). Работу с биологическим материалом проводить только предварительно обработанным инструментом. Отработанный материал помещается в определенные емкости для дальнейшего обеззараживания.
8. При случайном попадании биологического материала на руки, стол или другие поверхности сразу провести их обработку дезинфицирующим раствором.
9. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место, протереть поверхность лабораторного стола и тщательно вымыть руки с использованием дезинфицирующих средств.

Правила работы в микробиологической лаборатории. Составление сред и методы стерилизации

Задачи

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Ознакомиться с рецептурой, техникой приготовления и требованиями, предъявляемыми к основным питательным средам.
3. Овладеть различными методами стерилизации.
4. Подготовить материалы и питательные среды для стерилизации.

Введение

Классификация сред для бактерий

По исходным компонентам различают *натуральные* и *синтетические* среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений (соли, углеводы, аминокислоты, витамины и др.).

По консистенции (степени плотности) среды бывают *жидкие*, *плотные* и *полужидкие*. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин (прилож. 1, рис. 1П, 2П).

Агар, получаемый из некоторых морских водорослей, уникален тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится при температуре примерно 100 °С и затвердевает при температуре около 40 °С. Необходимо учитывать, что агар сохраняет свои свойства при рН, близком к нейтральному.

Желатин – белок, получаемый из костей, хрящей и кожи животных. Образующий им гель плавится при температуре 24–26 °С. Многие микроорганизмы продуцируют ферменты, разлагающие желатин, поэтому его

главным образом используют для определения протеолитической активности микроорганизмов с целью их идентификации.

По назначению выделяют: *основные* (общеупотребительные) среды, предназначенные для культивирования микроорганизмов, как то: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА); *элективные* (избирательные) среды – для преимущественного выделения определенной группы микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств (минерально-солевая среда «К»); *специальные* среды – для выявления роста бактерий, которые не растут на универсальных средах, например, желочная среда Мак-Коя и Чепина (для получения роста возбудителя туляремии); *диагностические* среды – для быстрого разграничения микроорганизмов разных видов. Среда должны быть стерилизованы непосредственно после приготовления.

Стерилизация

В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах.

Различают *термическую* и *холодную* стерилизацию. В микробиологии находят применение следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (180–220 °С), стерилизация текучим паром, насыщенным паром под давлением (автоклавирование), кипячение. Из методов холодной стерилизации в микробиологии используют стерилизацию фильтрованием, химическими веществами и дезинфицирующими растворами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

Практическая работа

Материалы, оборудование. Конические колбы с пробками на 100, 250, 1000 мл. Цилиндр на 100 мл. Стеклянные пробирки с ватно-марлевыми пробками. Стерильные чашки Петри. Диски фильтровальной бумаги диа-

метром 90 мм. Упаковочный материал. Дистиллированная вода. Питательный агар. Сухие минеральные соли. Углеводороды. Автоматические пипетки (дозаторы). Весы технические. Сухожаровой шкаф. Автоклав.

1. Записать правила работы и поведения в микробиологической лаборатории

2. Дать характеристику микробиологическим средам

по физическому состоянию:

плотные _____
 полужидкие _____
 жидкие _____

по составу:

естественные _____

 синтетические _____

 полусинтетические _____

по назначению

консервирующие _____

 элективные _____

 дифференциально-диагностические _____

3. Дать характеристику способам стерилизации

Материал	Метод стерилизации	Условия стерилизации
Чашки Петри (стеклянные)		
Наконечники для дозаторов		
Бактериологические петли		

Занятие 1

Материал	Метод стерилизации	Условия стерилизации
Питательные среды, не содержащие сахара		
Питательные среды, содержащие сахара, витамины		

4. Изучить составы разных питательных сред и заполнить таблицу

Среда	Тип среды по составу	Способ приготовления	Назначение среды
Мясопептонный агар (МПА)		Размешать 38,5 г порошка, содержащего пептон, мясной экстракт и агар-агар в 1000 мл дистиллированной воды до растворения комков. Стерилизовать два раза автоклавированием при 1 ати, 30 мин. Охладить до 45–50 °С, разлить в стерильные чашки Петри по 20–30 мл (слоем 4–6 мм)	
Минерально-солевая среда «К»		Растворить в дистиллированной воде (г/л): KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; MgSO_4 – 0,2; CaCl_2 – 0,02; FeCl_3 – 0,001; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; агар – 15. Стерилизовать два раза автоклавированием при 0,5 ати. Охладить до 45–50 °С, разлить в стерильные чашки Петри по 20–30 мл (слоем 4–6 мм). Стерильно добавить смесь углеводов C_{12} – C_{16} (1,0 % v/v) в качестве единственного источника углерода и энергии	
0,5%-ный р-р NaCl		Растворить 5 г NaCl в 1000 мл дистиллированной воды. Разлить по пробиркам. Стерилизовать автоклавированием при 1 ати	

5. Приготовить питательные среды и растворы

Процедура

А. Приготовить 500 мл МПА в колбе на 1000 мл согласно прописи. Для этого добавить 500 мл дистиллированной воды в колбу. Сделать расчет количества сухого порошка для приготовления питательной среды: если на 1000 мл питательного агара необходимо _____ г сухого порошка, то _____ г необходимо для приготовления 500 мл МПА. Взвесить требуемое количество и добавить в колбу. Перемешать до растворения порошка. Закрывать колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на

горлышке. Написать название среды «МПА» и режим стерилизации «1,0 ати».

Б. Приготовить 500 мл минеральной среды "К" в колбе на 1000 мл. Для этого добавить 500 мл дистиллированной воды в колбу. Взвесить каждый ингредиент согласно прописи из расчета на 500 мл среды:

_____ г KNO_3 ; _____ г NaCl ;
 _____ г MgSO_4 ; _____ г CaCl_2 ;
 _____ г FeCl_3 ; _____ г KH_2PO_4 ;
 _____ г K_2HPO_4 ; _____ г агар-агара.

Перемешать до растворения ингредиентов. Закрывать колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на горлышке. Написать название среды «К» и режим стерилизации «0,5 ати».

В. Приготовить 100 мл 0,5%-ного р-ра NaCl в колбе на 250 мл. Какое количество дистиллированной воды и NaCl необходимо для этого?

6. Подготовить материалы

Процедура

А. Завернуть в упаковочную бумагу одну коробку с наконечниками для пипеток на 1 мл и одну коробку с наконечниками на 0,2 мл. Маркировать коробки с указанием объема наконечников и режима стерилизации «1,0 ати».

Б. Поместить 10 круглых бумажных фильтров диаметром, равным крышке чашки Петри, в стакан и накрыть бумажным колпачком. Стерилизовать при 1,0 ати.

В. Приготовить 100 мл дистиллированной воды в колбе на 250 мл, закрыть колбу ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком и закрепить резинкой на горлышке. Стерилизовать при 1,0 ати.

7. Разлить питательные среды в чашки Петри

Колбу со стерильным питательным агаром поместить на водяную баню (45 °С) и нагреть ее до жидкого состояния среды.

Г. С помощью пипетки разлить по 9 мл 0,5%-ного р-ра NaCl в 6 пробирок. Закрывать пробирки ватно-марлевыми пробками, поместить в банку, прикрыть ее бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой. Написать название р-ра «0,5% NaCl» и режим стерилизации «1,0 ати».

Г. Пустую колбу на 100 мл закрыть ватно-марлевой пробкой, прикрыть бумажным колпачком сверху и закрепить резинкой на горлышке. Стерилизовать при 1,0 ати.

Д. Поместить колбы, пробирки и другие подготовленные материалы в корзину, отнести на стерилизацию в автоклавную комнату.

Е. После автоклавирования все материалы охладить до комнатной температуры. Что произошло с агаром в питательной среде?

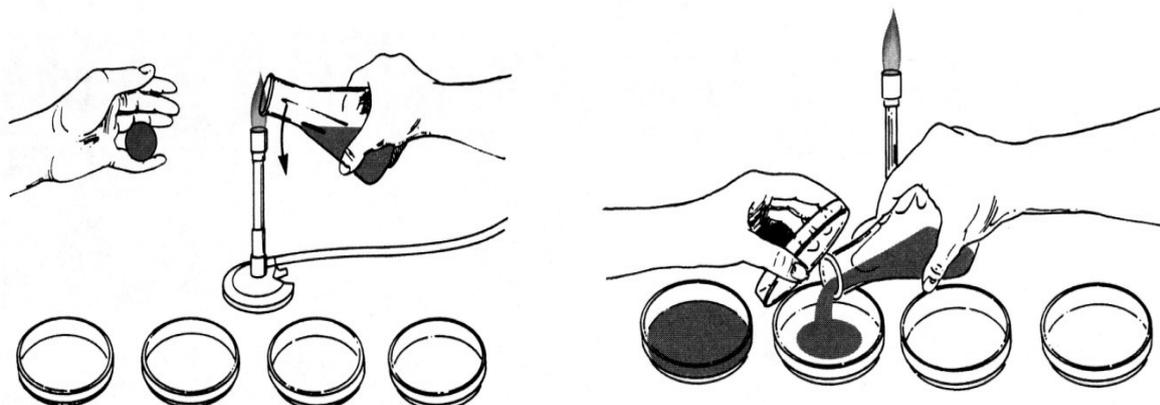


Рис. 1. Последовательность процедуры разлива питательной среды

Процедура

А. Зажать пробку колбы между пальцев и, удерживая ее, открыть колбу. Обжечь горло колбы, пронося ее через пламя.

Б. Приоткрыв крышку стерильной чашки Петри, налить среду на дно слоем 5 мм. Закрыть крышку и повторить процедуру с другой чашкой. При этом держать колбу под углом. Разлить среду таким образом во все

чашки. Пустую колбу закрыть пробкой и отставить в сторону.

В. Через 15 мин после застывания среды в чашках перевернуть их вверх дном для предотвращения попадания конденсата на агаровую пластинку. Поместить чашки в термостат с температурой 36 °С, чтобы подсушить среду.

Заключение

Контрольные вопросы

1. Укажите температуру насыщенного пара при давлении в автоклаве 0,5 ати _____?
1,0 ати _____? 1,5 ати _____?

2. Тиндализация – это

3. Какие вещества используют в качестве индикаторов контроля температуры в автоклаве?

Подпись преподавателя _____

Выделение и количественный учет микроорганизмов высевом на плотные питательные среды

Задачи

1. Подготовить почвенные образцы к анализу.
2. Освоить метод высева на плотные питательные среды.
3. Ознакомиться с методами культивирования микроорганизмов.
4. Определить количество клеток в почве высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха).

Введение

О росте микроорганизмов в естественных субстратах судят по количеству клеток или биомассе в единице объема. Выбор метода зависит от цели (например, определить количество гетеротрофных микроорганизмов или число жизнеспособных клеток), свойств питательной среды, особенностей роста и морфологии бактерий. Условно методы делят на *прямые* (подсчет под микроскопом, взвешивание) и *косвенные* (по числу колоний на питательных средах после высева, по содержанию белка в биомассе и пр.).

В естественных субстратах клетки часто находятся в прикрепленном (адсорбированном) состоянии. Для отделения их друг от друга и частиц субстрата применяют пере-

мешивание, обработку ультразвуком, поверхностно-активные вещества (ПАВ). Одним из основных и часто используемых методов в микробиологии является высев на плотные питательные среды, предложенный немецким ученым Робертом Кохом (чашечный метод Коха). Сущность метода заключается в высеве определенного объема суспензии микроорганизмов на твердую питательную среду и подсчете выросших колоний, которые считают потомством одной клетки, точнее колониеобразующей единицы (КОЕ), которой может быть вегетативная клетка, спора, кусочек мицелия.

При работе с почвенным субстратом необходимо определить его *гигроскопическую* влажность в процентах от массы сухой почвы. Это значение используется для вычисления коэффициента пересчета результатов микробиологического анализа исходного образца почвы на абсолютно сухую почву.

⚠ *Статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке. Чашечный метод требует большой чистоты и аккуратности. Случайно попавшая клетка может завысить число микроорганизмов исследуемой суспензии.*

Практическая работа

1. Определение влажности почвенных образцов

Материалы, оборудование. Почвенный образец. Пинцет. Шпатель металлический. Ступка с пестиком. Сито с отверстиями диаметром 1 мм. Перчатки. Анализатор влажности AND MX-50 (AND, Япония).

Процедура

А. Из пробы, поступившей на анализ, пинцетом удалить крупные растительные

остатки, измельчить вручную в ступке пестиком и просеять через сито. Из подготовленной почвы отобрать аналитическую пробу массой 5–10 г.

Б. Включить прибор «Анализатор влажности» (прилож. 1, рис. 3П). Убедиться, что на индикаторной панели установлена программа 1 (prog. 1), температура 105 °С, режим нагрева 1 (Heating pattern).

В. Специальную алюминиевую тарелку положить на поддерживающее устройство прибора, закрыть крышку и включить прибор, нажав кнопку START. Дождаться, когда прибор высушит пустую тарелку и остановит процедуру нагревания. Окончание работы прибора будет сопровождаться звуковым сигналом. Обнулить показание весов, нажав на кнопку RESET.

Г. Аккуратно положить образец грунта на тарелку, равномерно распределяя его по площади. Желательно, чтобы масса навески была 5–10 г. Закрыть крышку и включить прибор, нажав кнопку START.

Д. После остановки прибора записать полученный результат – величину гигроскопической влажности (W) в %.

W = _____

Коэффициент пересчета (K_w) результатов анализа исходного образца на абсолютно сухую почву вычисляют по формуле:

$$K_w = (100 + W) : 100.$$

Сделать расчет по своим данным.

K_w = _____

2. Подготовка почвенного образца к микробиологическому анализу

Материалы, оборудование. Стекло 50×50 см. Пинцет. Шпатель металлический. Пустая стерильная колба на 100 мл. Стерильная вода. Автоматическая пипетка. Спиртовая горелка. Этиловый спирт 96%-ный. Вата. Весы технические. Ультразвуковой дезинтегратор Elmasonic L10H.

Процедура

А. Хорошо перемешанную почву высыпать на стекло, протертое спиртом и обожженное пламенем горелки. Почву тщательно перемешать шпателем и разложить ровным слоем. Пользуясь пинцетом, удалить корешки и другие посторонние включения. Непосредственно перед работой шпатель и пинцет прокалить в пламени и слегка остудить на воздухе. Из разных мест почвы, распределенной на стекле, шпателем отобрать

небольшие порции и в стерильной, предварительно тарированной ёмкости взвесить на технических весах 1 г среднего образца. Далее образец переместить в пустую стерильную колбу и залить 10 мл воды (рис. 1).

Б. Для разрушения почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц пробу обработать на ультразвуковой установке в течение 2–3 мин. После озвучивания пробу перемешать на магнитной мешалке в течение 5–10 мин. Затем суспензии дать отстояться 30 сек, чтобы осели крупные частицы, и тотчас же использовать ее для приготовления разведений. При этом учитывать, что в полученной исходной суспензии исследуемый материал (почва) разведен в 10 раз (1:10).

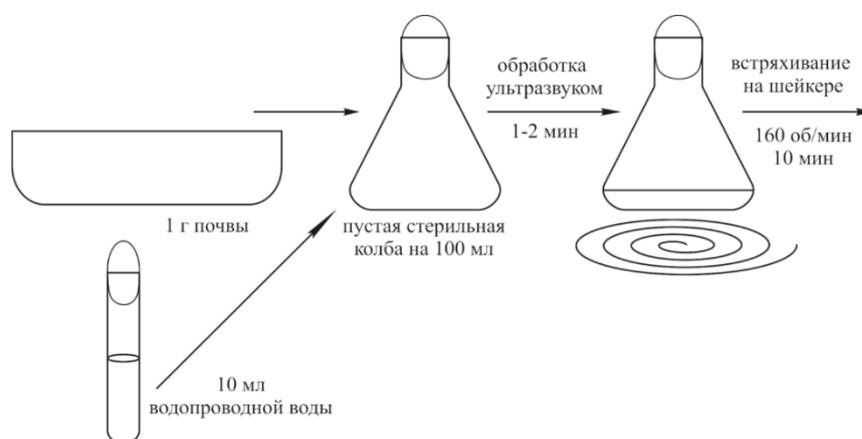


Рис. 1. Схема подготовки образца почвы к микробиологическому анализу

3. Приготовление разведений почвенной болтушки

Материалы, оборудование. Колба на 100 мл с исходным материалом (почвенная суспензия). Пробирки с 9 мл стерильного 0,5%-ного водного р-ра NaCl. Спиртовая горелка. Автоматическая пипетка.

Процедура

Сделать ряд десятикратных разведений в стерильном 0,5%-ном водном р-ре NaCl согласно схеме (рис. 2) (прилож. 1, рис. 4П).

А. Подписать пробирки в соответствии с номером пробы и ее разведением.

Б. Стерильной пипеткой (наконечником) перенести 1,0 мл исходного материала в пробирку с 9,0 мл стерильного р-ра NaCl – это разведение $1:10^2$. Сбросить наконечник.

В. Суспензию тщательно перемешать с помощью нового стерильного наконечника, вбирая в пипетку и выпуская из нее почвенную взвесь 3–5 раз (прилож. 4).

Г. Затем этой же пипеткой (наконечником) взять 1,0 мл полученного разведения и перенести его во вторую пробирку – это разведение $1:10^3$. Аналогичным образом готовить и последующие разведения до $1:10^6$.

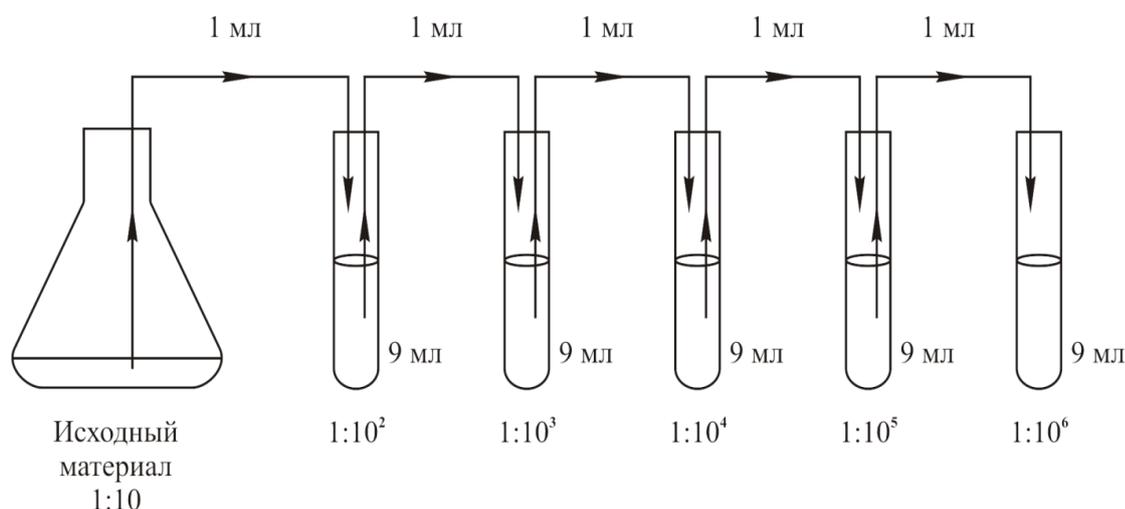


Рис. 2. Схема приготовления ряда десятикратных разведений исходного материала

4. Проведение микробиологического посева поверхностным способом (чашечный метод Коха)

Материалы, оборудование. Стерильные чашки Петри с агаризованной минерально-солевой средой «К» и МПА. Автоматическая пипетка. Стеклоанный шпатель Дригальского. Бумажные фильтры диаметром 90 мм. Смесь углеводов (C_{12} – C_{16}). Термостат.

Процедура

Согласно схеме (рис. 3) высевы на плотную питательную среду проводят из трех последних разведений, в 3-кратной повторности.

А. Подписать чашки с питательным агаром со стороны дна в соответствии с номером пробы и ее разведением.

Б. Стерильной пипеткой внести точно 0,05 мл (50 мкл) соответствующего разведения почвенной взвеси на поверхность питательной среды. Измеренный объем распределить стерильным стеклянным шпателем.

В. После посева на плотную минерально-солевую среду «К» поместить под крышку каждой чашки Петри бумажный фильтр и пропитать его смесью углеводов (C_{12} – C_{16}) в количестве 0,5 мл.

Г. После посева все чашки Петри поместить в термостат для культивирования крышками вниз (прилож. 1, рис. 5П).

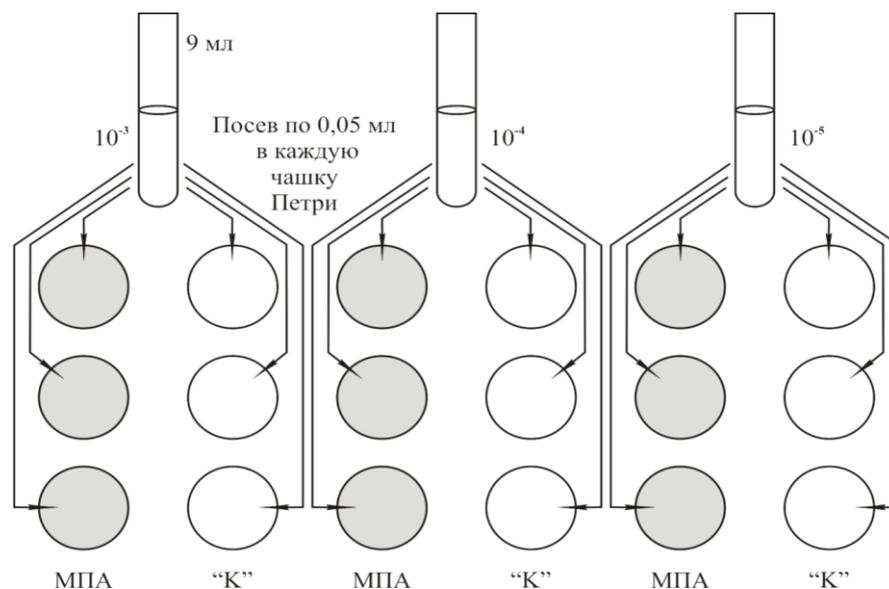


Рис. 3. Схема посева почвенной взвеси шпателем

Наблюдения и результаты

1. Произвести подсчет выросших колоний, не открывая чашек и отмечая колонии точкой с помощью маркера по наружной стороне дна чашки Петри. Использовать счетчик колоний (прилож. 1, рис. 6П).
2. Полученные данные занести в табл. 1 и 2.
3. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г (1 мл) исходного образца, при уровне достоверности 95% ($P_{0,95}$) вычислить по формуле

$$(\bar{x} \pm 2\delta_x) \times K \times \frac{1}{V},$$

где \bar{x} – среднее число колоний, выросших на чашке при высеве из данного разведения;

2 – t -критерий при $P_{0,95}$;

δ_x – среднее квадратичное отклонение среднего арифметического;

K – коэффициент (фактор) разведения, из которого произведен высев (это 10^3 , 10^4 или 10^5);

V – объем суспензии, взятой для посева, мл.

Пример расчета:

колоний в чашке (\bar{x}) = 75,

среднее квадратичное отклонение (δ_x) = 5,0,

объем посевной капли (V) = 0,05 мл,

коэффициент разведения (K) = 10^4 ,

коэффициент влажности (K_w) = 1,25,

КОЕ в 1 г исходной почвы = $(75 \pm 2 \times 5,0) \times 10^4 \times 1/0,05 = (75 \pm 10,0) \times 10^4 \times 20 =$

$(150 \pm 20,0) \times 10^5 = (1,5 \pm 0,2) \times 10^7$,

КОЕ в 1 г абсолютно сухой почвы = $(1,5 \pm 0,2) \times 10^7 \times 1,25 = (1,9 \pm 0,25) \times 10^7$.

4. Сделать расчет по результатам своего посева на среду МПА

КОЕ = _____

Ответ. Число колониеобразующих единиц *гетеротрофов*, содержащихся в 1 г пробы № _____, с учетом коэффициента влажности (K_w) составляет: _____

Табл. 1. Определение количества гетеротрофов в 1 г исходного образца на среде МПА

Разведение почвенной взвеси	Повторность опыта, n n = 3	Количество колоний, выросших в одной чашке, x	Общее количество подсчитанных колоний при высеве данного разведения, $\sum x$	Среднее число колоний, выросших из данного разведения, \bar{x} $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	Среднее квадратичное отклонение, δ_x $\delta_x = \pm \frac{\sqrt{\sum x}}{n}$
1:10 ³	1				
	2				
	3				
1:10 ⁴	1				
	2				
	3				
1:10 ⁵	1				
	2				
	3				

Табл. 2. Определение количества углеводородокисляющих (УВО) микроорганизмов в 1 г исходного образца на минеральной среде с углеводородом

Разведение почвенной взвеси	Повторность опыта, n n = 3	Количество колоний, выросших в одной чашке, x	Общее количество подсчитанных колоний при высеве данного разведения, $\sum x$	Среднее число колоний, выросших из данного разведения, \bar{x} $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$	Среднее квадратичное отклонение, δ_x $\delta_x = \pm \frac{\sqrt{\sum x}}{n}$
1:10 ³	1				
	2				
	3				
1:10 ⁴	1				
	2				
	3				
1:10 ⁵	1				
	2				
	3				

5. Сделать расчет по результатам своего посева на минерально-солевой среде «К»

КОЕ = _____

Ответ. Число колониеобразующих единиц УВО, содержащихся в 1 г пробы № _____, с учетом коэффициента влажности (K_w) составляет: _____

Контрольные вопросы

Раскройте содержание следующих понятий:

Инокуляция _____

Колония _____

Суспензия _____

Гетеротрофы _____

Микробная биомасса _____

Разведение _____

Коэффициент (фактор) разведения _____

Подпись преподавателя _____

Выделение чистых культур микроорганизмов

Задачи

1. Ознакомиться с условиями выделения чистых культур аэробов.
2. Выделить чистые культуры углеводородокисляющих бактерий из отдельных колоний.
3. Описать макроморфологические свойства свежевыделенных изолятов.

Введение

Морфологические, физиологические, биохимические и другие свойства микроорганизмов можно исследовать только при работе с чистыми культурами. *Чистой* называют культуру, содержащую микроорганизмы одного вида. Выделению чистой культуры обычно предшествует получение накопительной культуры в элективной питательной среде. Такая среда обеспечивает преимущественное развитие желаемых микроорганизмов, как правило, одной физиологической

группы. Следующий этап – выделение чистой культуры из накопительной. Он может быть осуществлен разными методами, среди которых основным является метод Роберта Коха. Это получение чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки.

При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов посев проводят поверхностным способом, распределяя материал из накопительной культуры по агаровой пластинке стерильным стеклянным шпателем. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих – рост изолированных колоний (рис. 1).

Рассеивать накопительную культуру и проводить проверку чистоты выделенной культуры можно как шпателем, так и бактериологической петлей методом истощающего штриха (прилож. 1, рис. 7П).

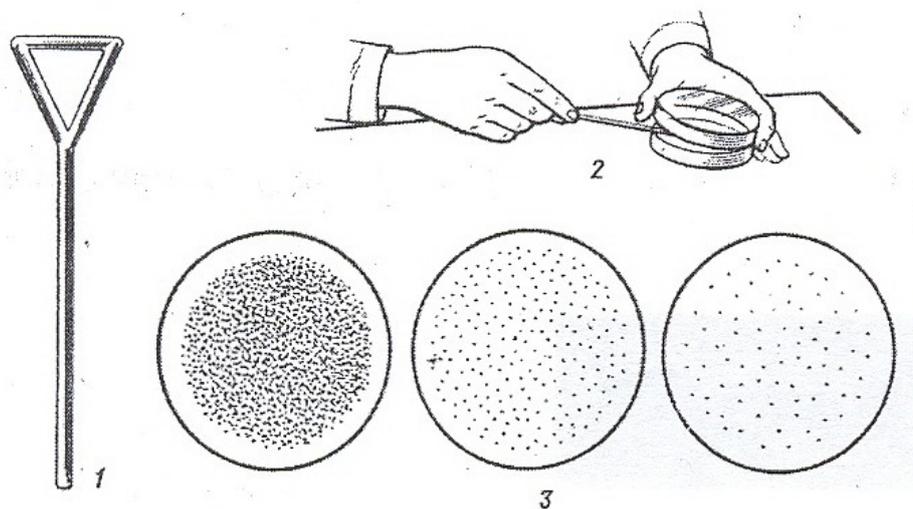


Рис. 1. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем: 1 – шпатель Дригальского; 2 – рассев; 3 – рост микроорганизмов после посева

Практическая работа

1. Рассев культуры шпателем

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Накопительная культура углеводородокисляющих микроорганизмов в жидкой минерально-солевой среде «К» с *n*-гексадеканом. Пробирки с 10 мл стерильной водопроводной воды. Чашки Петри с агаризованной питательной средой. Стеклошпатель Дригальского. Бактериологическая петля. Спиртовая горелка.

Процедура

Делают два высева: непосредственно из накопительной культуры и из разведения её в стерильной водопроводной воде.

А. Подписать чашки с питательным агаром со стороны дна в соответствии с номером накопительной культуры и ее разведением.

Б. Стерильной пипеткой внести 0,1 мл накопительной культуры в пробирку с 10 мл стерильной водопроводной воды и тщательно перемешать.

В. Раскалить петлю докрасна, позволить ей остыть и асептически взять небольшое количество посевного материала («зеркальце» суспензии в петле) непосредственно из накопительной культуры или из её разведения в стерильной воде.

Г. Этот объем нанести на поверхность агаризованной среды в первую чашку, распределить стерильным шпателем по всей поверхности среды, а затем этим же шпателем провести последовательно по поверхности среды еще в 4 чашках Петри.

2. Рассев микробных клеток методом истощающего штриха

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Накопительная культура углеводородокисляющих микроорганизмов в жидкой минерально-солевой среде «К» с *n*-гексадеканом. Чашки Петри агаризованными питательными средами. Бактериологическая петля. Спиртовая горелка.

Процедура

Рассев бактериальных клеток методом истощающего штриха (рис. 2) осуществляют, держа чашку Петри на рабочем столе или в руке перед пламенем горелки.

А. Подписать чашки с питательным агаром со стороны дна в соответствии с номером накопительной культуры и ее разведением.

Б. Раскалить петлю докрасна, позволить ей остыть и отобрать «зеркальце» петли непосредственно из накопительной культуры или из разведения её в стерильной воде.

В. Приоткрыв чашку Петри провести штрихи, нежно касаясь петлей поверхности плотной среды в первом секторе (1). Стараться не повредить агар в чашке Петри.

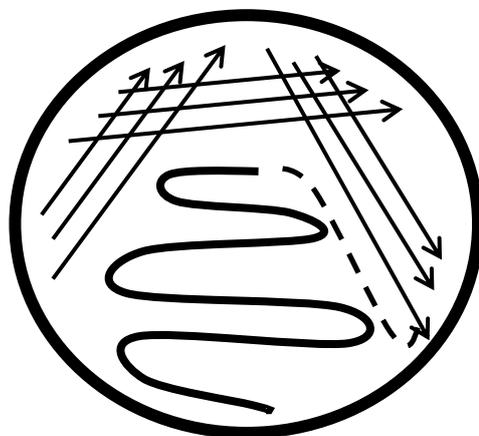


Рис. 2. Схема последовательности (1–4) рассева микробных клеток на поверхности плотной среды бактериологической петлей

Г. Фламбировать петлю и вновь ее охладить. Повернуть чашку так, чтобы следующий сектор находился сверху. Провести новые штрихи, пересекая область первого сектора (2).

Д. Фламбировать петлю, вновь повернуть чашку и провести штрихи, пересекая область второго сектора (3).

3. Инкубирование

Оборудование. Термостат.

Процедура

А. Чашки с МПА и минерально-солевой средой «К» с *n*-гексадеканом (для культивирования углеводородокисляющих бактерий) поместить в термостат в перевернутом виде крышками вниз на срок от 2 до 7 сут. Почему в перевернутом виде?

4. Отсев отдельных колоний микробных культур на свежую питательную среду

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Микробные колонии изолятов на агаризованной питательной среде. Бактериологическая петля. Бактериологическая игла. Скошенный МПА в пробирках. Спиртовая горелка.

Процедура

А. Стерилизовать бактериологическую иглу фламбированием, затем охладить ее. Почему следует использовать иглу вместо бактериальной петли?

Е. Вновь повернуть чашку и провести петлей волнистую линию по области свободного пространства на поверхности агара (4). Фламбировать свою петлю перед тем, как убрать ее на место. Почему?

Б. Для выявления газоокисляющих микроорганизмов на минерально-солевой среде «К» чашки загрузить в вакуумный эксикатор и создать атмосферу пропан-воздух (1:1). Продолжительность культивирования 14 сут при температуре 28–30 °С.

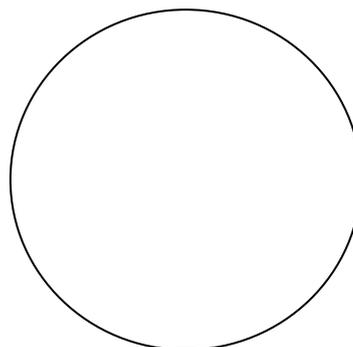
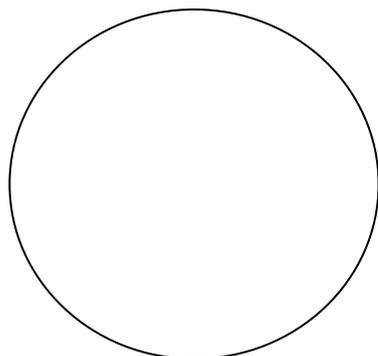
Б. Коснуться центра точечной колонии, расположенной на линии рассеивающего штриха, затем асептически провести линию на поверхности скошенного агара. Как вы считаете, если взяли только одну колонию, вы получите чистую культуру? Почему?

В. Инкубировать субкультуру в пробирках при температуре 28–30 °С до визуально хорошего роста.

Наблюдения и результаты

После инкубирования рассмотрите колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри.

1. Зарисовать вид чашек с рассеивающим штрихом.



2. Отметить, описать и зарисовать преобладающие формы (2–3 вида), выбирая изолированные колонии (прилож. 1, рис. 8П, 9П, 10П А). Заполнить табл. 1 и 2. При описании колоний чашки Петри не открывать. Описание проводить по схеме, используя термины макроморфологических признаков:

Форма колоний – см. рис. 3.

Размеры – диаметр в мм. Если размеры колонии не превышают 1 мм, то такие колонии называют точечными.

Оптические свойства – прозрачная, полупрозрачная (просвечивает), непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая.

Цвет – отмечают цвет колонии, выделяется или не выделяется пигмент в среду.

Профиль – плоский, выпуклый, кратерообразный, врастающий в агар (рис. 4).

Поверхность – гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая.

Край колонии – ровный, волнистый, лопастной, ризоидный, зубчатый, ветвистый (рис. 5).

Структура колоний – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая (рис. 6).

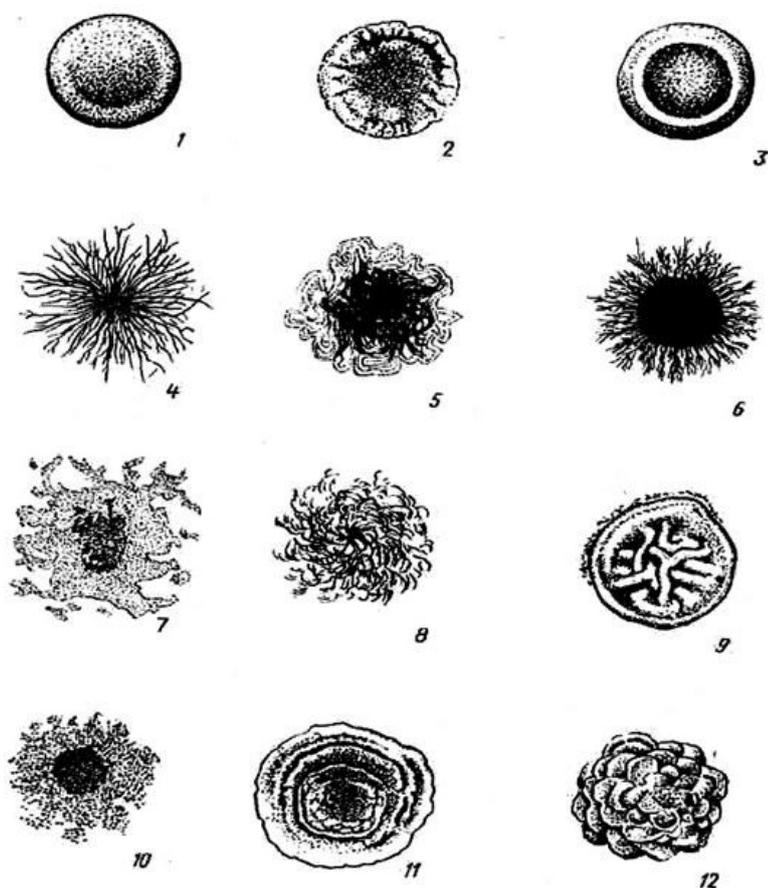


Рис. 3. **Форма колоний:**

- 1 – круглая;
- 2 – круглая с фестончатым краем;
- 3 – круглая с валиком по краю;
- 4 и 5 – ризоидная;
- 6 – с ризоидным краем;
- 7 – амёбовидная;
- 8 – нитевидная;
- 9 – складчатая;
- 10 – неправильная;
- 11 – концентрическая;
- 12 – сложная

Консистенция – маслянистая, тестообразная, вязкая, слизистая, пленчатая, хрупкая. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой, врастающей в агар. Консистенцию определяют, прикасаясь к ее поверхности петлёй или иглой.

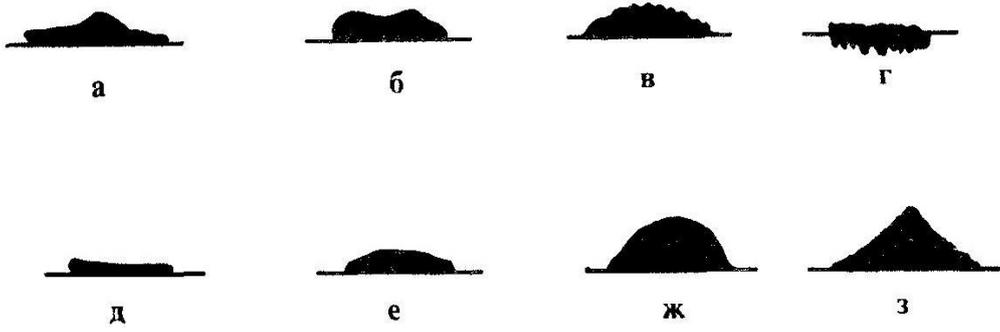


Рис. 4. Профиль колоний: а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – растущий в агар; д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный

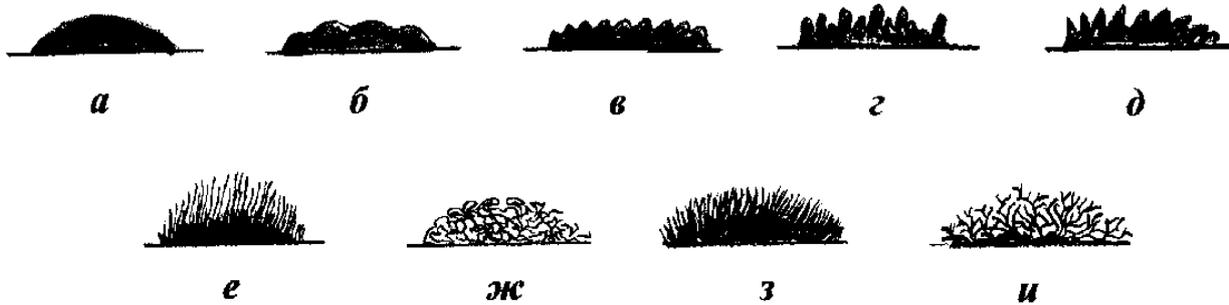


Рис. 5. Край колоний: а – гладкий; б – волнистый; в – зубчатый; г – лопастной; д – неправильный; е – реснитчатый; ж – нитчатый; з – ворсинчатый; и – ветвистый

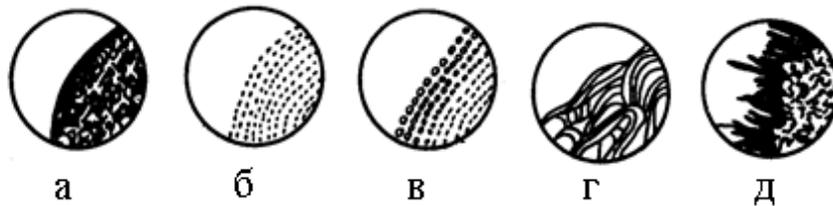


Рис. 6. Структура колоний: а – однородная; б – мелкозернистая; в – крупнозернистая; г – струйчатая; д – волокнистая

Табл. 1. Признаки колоний микроорганизмов, выросших на МПА

№ колонии	Форма	Размеры, мм	Оптические свойства	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок колонии

Табл. 2. Признаки колоний микроорганизмов, выросших на поверхности минерально-солевой среды «К»

№ колонии	Форма	Размеры, мм	Оптические свойства	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок колонии

3. По истечении срока инкубирования чистой субкультуры описать характер роста микроорганизмов по штриху (прилож. 1, рис. 10П Б, В, Г) на скошенном агаре по схеме и заполнить табл. 3.

Интенсивность роста по штриху – рост скудный, умеренный, обильный.

Особенности роста – налет сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный в виде цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный (рис. 7).

Оптические свойства штриха – цвет, прозрачность, блеск, яркость, флуоресценция.

Характер поверхности – гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая.

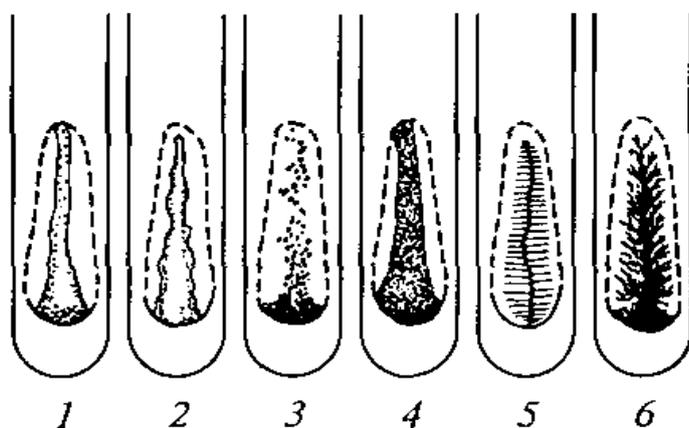


Рис. 7. Особенности роста по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Табл. 3. Описание роста микроорганизмов по штриху

№ культуры / среда	Интенсивность роста	Особенности роста	Оптические свойства штриха	Характер поверхности

5. Проверить чистоту выделенных микробных культур визуально, микроскопированием и рассевом на поверхность агаризованной питательной среды.

2. Что понимают под макроморфологическими свойствами микроорганизмов?

3. Охарактеризуйте рост микроорганизмов в жидкой среде.

Подпись преподавателя _____

Устройство светлопольного микроскопа и правила работы с ним

Задачи

1. Изучить правила работы и устройство микроскопа.
2. Разобрать принцип и порядок работы с фазово-контрастным устройством.
3. Ознакомиться с правилами установки освещения по Кёллеру.
4. Освоить работу с иммерсионной системой микроскопа.

Введение

Микроскоп – оптический прибор, дающий обратное изображение изучаемого объекта (прилож. 1, рис. 11П). Позволяет рассматривать детали строения организмов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза. Различают две основные системы микроскопа – механическую и оптическую. *Механическая система* включает: штатив с фокусирующим устройством для грубой и точной настройки; коаксиально (совмещённо) расположенные рукоятки настройки фокуса; револьверное устройство для крепления объективов; тубус (моно-, би-, тринокулярный); предметный столик, регулируемый по высоте; ирисовые диафрагмы.

Оптическая система включает: коллектор с регулируемой полевой диафрагмой; конденсор с регулируемой апертурной диафрагмой; объективы; окуляры.

Объектив – система линз, которые в совокупности дают нужное увеличение. Все основные сведения об объективе можно найти на металлическом корпусе современных объективов: производитель (Zeiss / Olympus / Micros и др.), линейное увеличение (10x / 40x / 100x и др.); числовая апертура (0,25 / 0,65 / 1,25 и др.); иммерсия (Oil / W / Glycer / Mul); метод контрастирования (Ph / DIC); коррекция aberrаций (недостатков) линз (Ach / Plan / Apo); тубусное расстояние

(160 / ∞); покровное стекло (стандарт – 0,17, без стекла – 0).

Важно обратить внимание на цветную маркировку объективов, которая помогает быстро выбрать нужный объектив: цветная кодировка кратности увеличения (красная – 5x, желтая – 10x, синяя – 40x, белая – 100x), цвет надписи (черный – стандарт, зеленый – фазовый контраст и др.); вид иммерсионной жидкости (черный – масло, белый – вода и др.).

Окуляр – система из 2 и более линз. Предназначен для рассматривания изображения, формируемого объективом, т. е. выполняет роль лупы. На корпусе окуляров указано: линейное увеличение (10x, 15x, 20x и др.), линейное поле зрения, мм (118, 20, 22); возможность использования очков, возможность фокусировки для близоруких и дальнозорких.

Увеличение микроскопа определяется как увеличение объектива, умноженное на увеличение окуляра. Однако общее увеличение не отражает всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может быть нечетким. Отчетливость изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, которая зависит от длины волны используемого света (λ) и числовой апертуры объектива (A_1) и конденсора (A_2). В свою очередь, разрешающая способность – есть величина, обратная пределу разрешения (d), который определяется по формуле

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2}.$$

Таким образом, чем меньше предел разрешения (минимальное расстояние до которого две точки не сливаются в одну), тем выше разрешающая способность микроскопа. Используя более короткие лучи для освещения объекта, например, ультрафиоле-

товые, выбирая объектив с большой числовой апертурой и применяя конденсор, можно добиться максимальной разрешающей способности для микроскопа и увидеть структурную организацию клетки и даже крупные вирусы.

Числовая апертура (A) от латинского «*aperture*» отверстие – это безразмерная величина, которая является мерой количества света и определяется размерами линз или диафрагмами при прохождении света.

Её определяют по формуле

$$A = n \times \sin 1/2 \alpha,$$

где n – показатель преломления среды, граничащей с фронтальной линзой объектива; α – угол светового конуса лучей, входящих в объектив. Числовая апертура линзы, граничащей с воздухом не может быть больше 1, так как коэффициент преломления воздуха

равен 1, а половина угла α не может быть больше 90° , значит, $\sin 1/2 \alpha \leq 1$.

Если между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом поместить каплю жидкости, можно повысить числовую апертуру объектива. Максимальный показатель преломления таких жидкостей, называемых иммерсионными, имеет кедровое масло ($n = 1,5$). Для работы с иммерсией используют специальные иммерсионные объективы (кодировка Oil), имеющие пружинящую оправу для предохранения от механических повреждений фронтальной линзы объектива и объекта.

Апертура объектива должна соответствовать числовой апертуре конденсора (рис. 1). Работая с объективом низкого увеличения, следует прикрывать диафрагму конденсора.

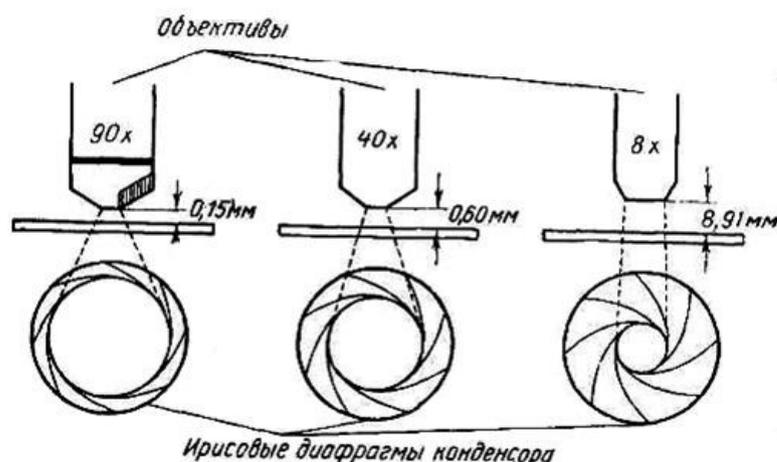


Рис. 1. Связь между увеличением объектива, рабочим расстоянием объектива и степенью раскрытия ирисовой диафрагмы конденсора

Фазово-контрастное устройство. Неокрашенные клетки микроорганизмов хорошо видны в светлом микроскопе при условии использования различных устройств для контрастирования. Микроскопия с фазово-контрастным устройством основана на преобразовании невидимых глазу фазовых изменений в видимые, – амплитудные – при прохождении световых лучей через препарат. В результате объект становится контрастным. Оптическая система для получения фазового контраста состоит из фазовой пластинки, расположенной в объек-

тиве (прозрачный диск с напылённым кольцом), и кольцевой диафрагмы, расположенной под конденсором (светонепроницаемый диск с прозрачной кольцевой щелью). Конструктивно фазово-контрастное устройство – это набор специальных фазовых объективов с маркировкой «Ph» и конденсор с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует фазовой пластинке определенного объектива (Ph1, Ph2, Ph3). Кольцевые диафрагмы установлены в револьверном диске конденсора Зернике и поворотом диска могут легко меняться.

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Фиксированные коммерческие препараты культур для настройки освещения по Кёллеру. Иммерсионное масло. Микроскоп.

1. Устройство микроскопа

Подписать основные части светового микроскопа (см. рис. 2).

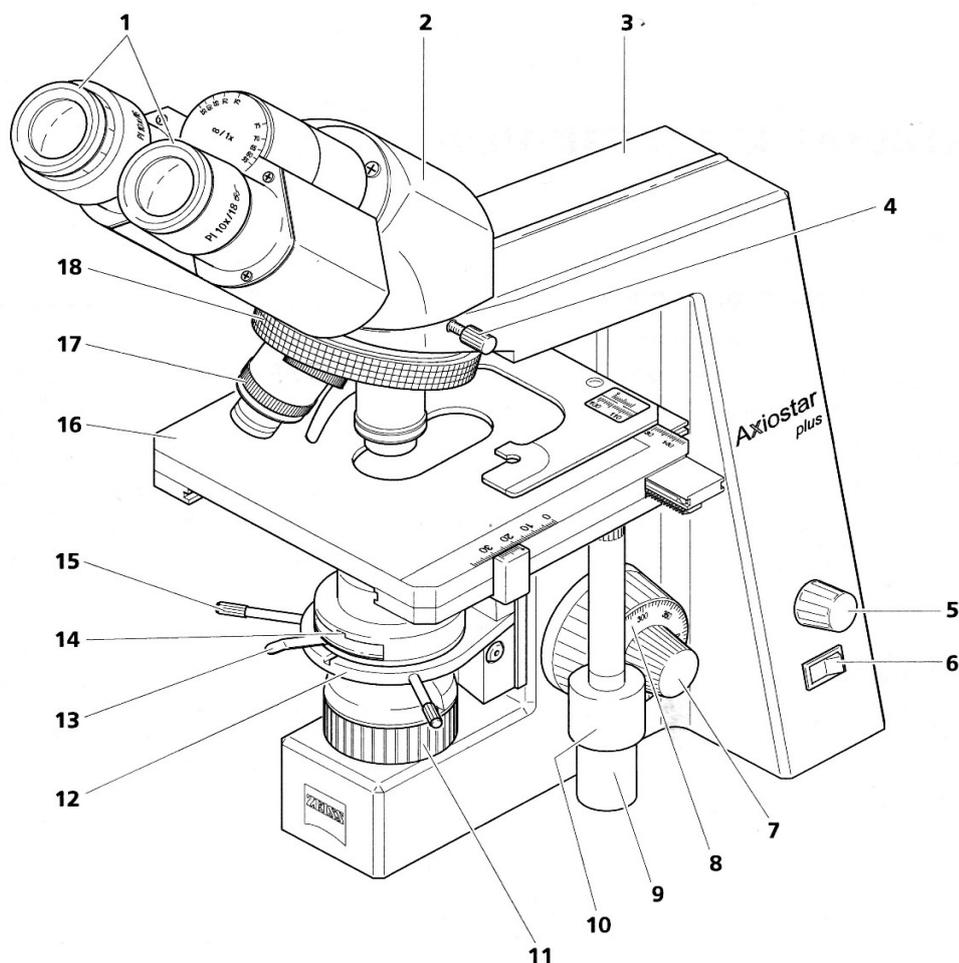


Рис. 2. Внешний вид лабораторного микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия)

2. Установка освещения по Кёллеру

Хорошие результаты при работе с микроскопом могут быть получены только при условии правильного освещения объекта. Лучший метод основан на системе Кёллера.

Процедура

А. Установить препарат на предметный столик. Ввести в ход лучей объектив 10х. Разместить препарат на расстоянии примерно 10 мм до объектива.

Б. Выбрать вставку для реализации светлого поля (НФ) в конденсоре Зернике.

В. Включить питание и медленно повернуть ручку настройки яркости для установки комфортной для глаз интенсивности освещения.

Г. Установить конденсор в самое верхнее положение.

Д. Открыть полностью ирисовую диафрагму осветителя и диафрагму конденсора.

Е. Используя винт грубой настройки фокуса, поднять столик, фокусируя объект.

Затем, используя винт точной настройки, подстроить фокус для детального просмотра препарата.

Ж. Закрывать почти полностью полевую ирисовую диафрагму осветителя, оставив только небольшое отверстие.

З. Глядя в окуляры, слегка опускать конденсор и четко фокусировать в плоскости препарата изображение краев ирисовой

диафрагмы осветителя. Открыть диафрагму осветителя настолько широко, чтобы полностью свести к нулю расстояние между краем диафрагмы и границей микроскопического изображения (не более чем на 2/3).

И. Работая с объективом 100х, диафрагму конденсора открыть полностью. Микроскоп готов к работе.

3. Правила работы с иммерсионной системой

Процедура

А. Каплю иммерсионной жидкости нанести на препарат, не размазывая ее по стеклу. Установить препарат на предметный столик.

Б. Глядя на препарат сбоку, поднимать столик до поверхности масляной капли (до видимой вспышки света) макровинтом.

В. Глядя в окуляры, осторожно погружать объектив в масло, продолжая вращать макровинт. Найти плоскость препарата. При

появлении изображения навести резкость с помощью микровинта.

Г. Наблюдать препарат, двигая его под объективом на предметном столике в двух взаимно перпендикулярных направлениях с помощью препаратоводителя.

Д. По окончании работ опустить столик, снять препарат и протереть линзу объектива кусочком фильтровальной бумаги, затем хлопчатобумажной салфеткой, слегка смоченной очищенным бензином или спиртом.

Контрольные вопросы

1. Как повысить разрешающую способность микроскопа?

2. Рассчитать и сравнить предел разрешения (d) микроскопа при использовании

- видимого света (длина волны 550 нм) и объектива с апертурой 1,25 _____ мкм?
- ультрафиолета (длина волны 200 нм) и объектива с апертурой 1,25 _____ мкм?

3. Как регулировать количество света в окулярах микроскопа?

4. Какой из объективов ближе всего устанавливают к препарату при микроскопировании?
_____ Почему?

Подпись преподавателя _____

Приготовление препаратов микроорганизмов. Выявление клеточных структур

Задачи

1. Ознакомиться с методами микроскопического анализа микроорганизмов.
2. Освоить технику приготовления препаратов живых и фиксированных клеток.
3. Изучить морфологические особенности клеток под микроскопом.
4. Освоить окраску клеток по Граму.

Введение

Обнаружение микроорганизмов, изучение их морфологических особенностей, выявление клеточных структур и запасных веществ в микробных клетках возможно с помощью световой микроскопии. В нативном (естественном) состоянии бактерии имеют такой же коэффициент преломления, как и стекло, поэтому они невидимы под микроскопом. Однако благодаря окрашиванию в светлом поле микроскопа видны тончайшие структуры (жгутики, капсулы, клеточные стенки, нуклеоид), некоторые включения и запасные вещества (полисахариды, липиды, полифосфаты).

Существуют простые и сложные способы окрашивания микробов. При простой окраске, которая позволяет быстро изучить морфологические особенности микробов (форма и размеры), обычно используют только один краситель, чаще всего красного цвета – фуксин или синего – метиленовый синий, генциановый фиолетовый (прилож. 1, рис. 12П). При этом прокрашивается вся клетка. Два или более контрастных красителя, дифференцирующие вещества и протравы применяют при сложных методах окраски. К таковым относятся методы Грама и Циля-Нельсена, позволяющие различать по цвету микроорганизмы, сходные по морфологическим свойствам. При дифференциальной окраске в большинстве случаев окрашивается не вся клетка, а лишь определенные ее структуры.

Метод окрашивания в большинстве случаев осуществляется после фиксации клеток, что не всегда желательно. Возможность наблюдать живые объекты, не прибегая к их фиксации и окрашиванию, существует при использовании специальных устройств в световом микроскопе для фазового, дифференциально-интерференционного (ДИК) и других видов контраста.

Для просмотра микроорганизмов в оптических микроскопах препараты готовят на предметных стеклах, толщина которых по условиям стандартизации не должна превышать 1,1 мм. Поверхность стекла должна быть очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по поверхности. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,17 мм. Чистые подготовленные стекла хранят в сухом состоянии или в этаноле.

Методика окрашивания по Граму является одной из важнейших методик для определения систематического положения исследуемых бактериальных изолятов. Данный метод дифференциальной окраски бактерий, отражающий их свойства и позволяющий разделить бактерии на две группы, был предложен в 1884 г. датским ученым Хансом Христианом Грамом (Hans Christian Gram) и заключается в последовательной обработке мазка кристаллическим фиолетовым, раствором йода и спиртом. Бактерии, сохраняющие сине-фиолетовую окраску, получили название *грамположительные*, а обесцветившиеся в результате вымывания спиртом, получили название *грамотрицательные* (прилож. 1, рис. 13П). Этот метод дифференциации клеток основан на различии в химическом составе клеточных оболочек.

Грамположительные бактерии имеют толстую, прочную, просто устроенную стенку (толщина более 50 нм). Основным компонентом клеточной стенки этих бактерий является многослойный пептидогликан

(муреин) (рис. 1А). Грамотрицательные бактерии содержат небольшое количество пептидогликана, не имеющего поперечных сшивок. Над слоем муреина располагается периплазматическое пространство, играющее важную роль в обменный процесс (периплазматические ферменты). Далее располагается наружная мембрана, которая имеет строение, характерное для биологических мембран (рис. 1Б).

Основной краситель интенсивно связывается с муреиновым слоем. Поскольку этот слой у грамотрицательных бактерий очень

тонкий и экранируется внешней мембраной, эти микроорганизмы сорбируют значительно меньше красителя, чем грамположительные. Йод образует с красителем и муреином сложный комплекс, который труднее вымывается обесцвечивающими растворами. Дифференцирующие растворы вымывают весь краситель из клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в то время как грамположительные еще содержат достаточное количество красителя. Дополнительный краситель докрашивает обесцвеченные грамотрицательные бактерии в контрастный цвет.

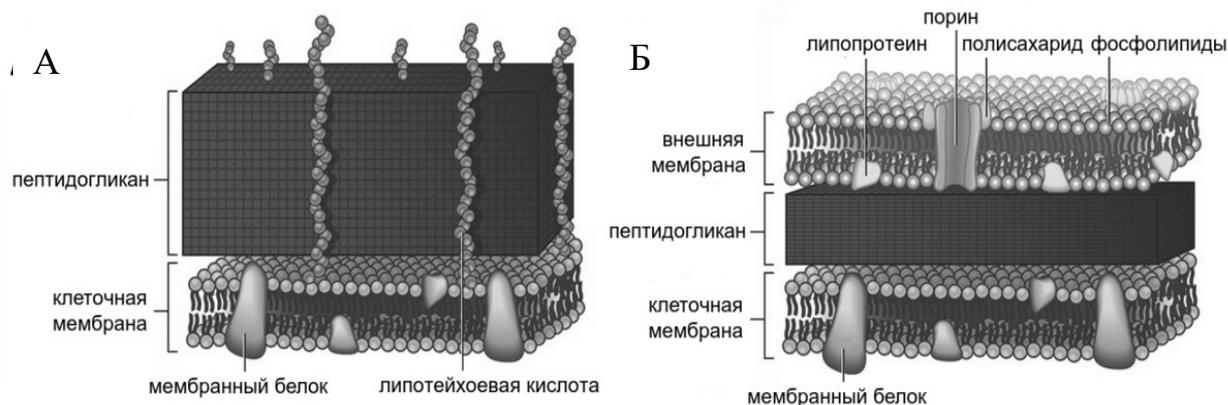


Рис. 1. Строение мембраны грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Штаммы бактерий из Коллекции ИЭГМ и природные изоляты. Предметные и покровные стекла. Пинцет. Бактериологическая петля. Пробирки с 0,5%-ным р-ром NaCl. Дистиллированная вода. Промывалка.

Фильтровальная бумага. Набор красителей для окраски по Граму. 3%-ный р-р КОН. Автоматические пипетки. Кювета для окрашивания препаратов. Иммерсионное масло. Микроскоп.

Приготовление препаратов живых клеток

1. Препарат «раздавленная капля» используют для установления формы клеток микроорганизмов, их размеров и взаимного расположения, способа спорообразования, наличия или отсутствия подвижности (прилож. 1, рис. 14П).

Процедура

А. Предметное стекло достать пинцетом, обжечь в пламени горелки и уложить на

стеклянный мостик для приготовления препарата.

Б. На сухое предметное стекло нанести небольшую каплю воды или 0,5%-ного р-ра NaCl с помощью петли или пипетки.

В. Используя охлажденную стерильную петлю, снять небольшое количество культуры, выращенной на плотной питательной среде, добавить к капле жидкости и переме-

шать. Культуру, выращенную в жидкой питательной среде, поместить на стекло с помощью стерильной пипетки. Воду в этом случае можно не добавлять.

Г. Каплю с исследуемым материалом накрыть покровным стеклом, плотно прижимая его к предметному стеклу. Избыток жидкости удалить фильтровальной бумагой.

2. Препарат «висячая капля» используют для наблюдения за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор, для выявления подвижности и отношения клеток к химическим раздражителям.

Приготовление препаратов фиксированных окрашенных клеток

Фиксированные окрашенные препараты используют для выявления ряда морфологических особенностей, количественного учета микроорганизмов, а также для проверки чистоты культуры. Эти препараты удобны тем, что могут храниться длительное время.

1. Окраска по Граму. Для интенсивной окраски по Граму рекомендуется использовать клетки молодых, чаще всего односуточных культур микроорганизмов. Необходимо проводить и параллельное окрашивание микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму заранее известно.

Процедура

А. Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло нанести исследуемый материал в каплю дистиллированной воды или р-ра NaCl и равномерно распределить его петлей на площади 1–2 см² возможно более тонким слоем. Почему тонкий мазок лучше плотного?

Б. Высушивание мазка. Препарат высушить при комнатной температуре на воздухе. Тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание мазка замедленно, препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха, держа предметное стекло высоко над пламенем горелки мазком вверх. Эту

Процедура

А. Каплю суспензии нанести на покровное стекло, перевернуть его каплей вниз и поместить на предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев лунки.

Б. Края лунки предварительно смазать вазелином для герметичности полученной камеры.

В. Микроскопировать препараты под увеличением $\times 1000$. Клетки подвижны?

операцию проводят очень осторожно, не перегревая мазок, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

В. Фиксация (прикрепление) клеток к стеклу. Преследует несколько целей: предохранить препарат от смывания; сделать мазок более восприимчивым к окраске, поскольку мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые; сделать безопасным дальнейшее обращение с мазком. Фиксацию клеток осуществлять над пламенем горелки. Для этого препарат трижды провести через наиболее горячую часть пламени, держа предметное стекло мазком вверх. Мазок не перегревать.

Г. Окраска

- Фиксированный препарат поместить на параллельные рейки над кюветой, покрыть полоской фильтровальной бумаги (для получения более чистых препаратов) и залить карболовым генциановым фиолетовым на 1–2 мин, следя за тем, чтобы краситель не подсыхал.

- Краситель слить и, не промывая препарат водой, обработать раствором Люголя в течение 1–2 мин до почернения.

- Слить раствор Люголя и обработать препарат 96%-ным этиловым спиртом в течение 0,5–1,0 мин для обесцвечивания, погружая и слегка покачивая предметное стекло в стаканчике со спиртом. Препарат промыть водой.

• Дополнительно окрасить 1–2 мин водным *фуксином*.

Д. По окончании окраски препарат промывать водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной.

Е. Высушить на воздухе или осторожно промокнуть фильтровальной бумагой.

2. Определение грам-типа бактерий по Крегенсену. Метод основан на разрушении клеточной стенки грамотрицательных

бактерий в щелочной среде и определении освобождённой ДНК.

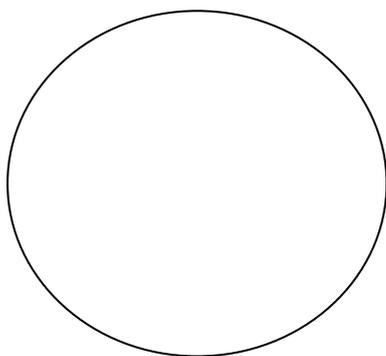
Процедура

А. На предметное стекло нанести одну каплю 3%-ного водного р-ра КОН.

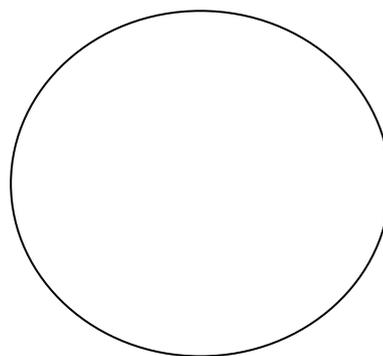
Б. В каплю щелочи поместить культуру микроорганизмов с агаризованной среды и тщательно перемешать. Выдерживать 1 мин.

Наблюдения и результаты

1. Микроскопировать препарат «раздавленная капля» под увеличением $\times 1000$ с применением фазово-контрастного устройства и иммерсионной системы. Зарисовать клетки. Описать морфологию и характер взаимодействия клеток друг с другом.



Препарат _____



Препарат _____

2. Микроскопировать окрашенный по Граму препарат под объективом 100x с масляной иммерсией. Определить грам-принадлежность исследуемых микробных культур.

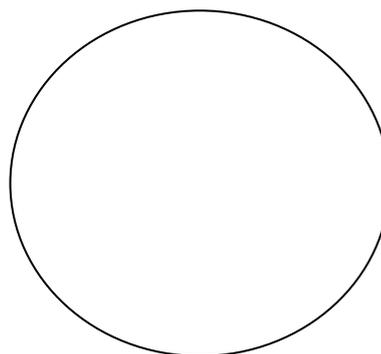
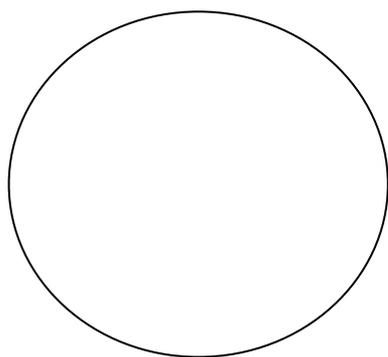
У *грамположительных бактерий* комплекс, образуемый генциановым фиолетовым и йодом, удерживается при обработке спиртом и дает **сине-фиолетовое** окрашивание.

У *грамотрицательных бактерий* комплекс отмывается при обработке спиртом, а при дополнительном окрашивании фуксином клетки приобретают **красный** цвет.

3. Перечислить этапы процедуры окрашивания по Граму, указать цвет грамположительных и грамотрицательных клеток после каждого этапа.

Этап	Химикат	Внешний вид клеток (цвет)	
		Грам (+)	Грам (-)
Фиксация	–		
Окраска	Генциановый фиолетовый		
Обработка	Раствор Люголя		
Обесцвечивание	96% этиловый спирт		
Докрашивание	Фуксин		

4. Зарисовать окрашенные клетки. Описать морфологию и характер взаимодействия клеток друг с другом. Указать грам-принадлежность бактериальной культуры.



Культура _____
Морфология _____

Культура _____
Морфология _____

Цвет _____
Грам-принадлежность _____

Цвет _____
Грам-принадлежность _____

5. Определить грам-принадлежность исследуемых бактериальных культур экспресс-методом по Крегенсену.

Если в течение 0,5–1,0 мин суспензия становится вязкой, желеобразной, то анализируемая культура *грамотрицательная*. Если же смесь остается гомогенной, не становится желеобразной, то культура *грамположительная*.

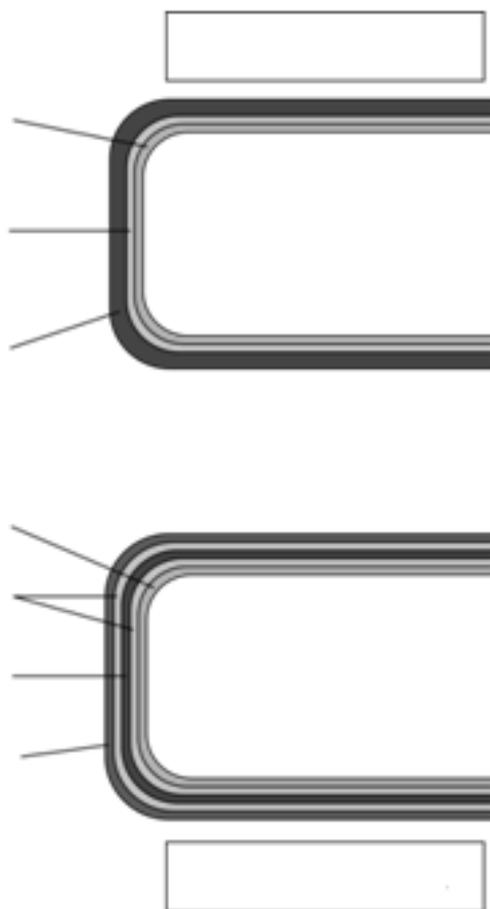
Культура				
Грам-принадлежность				

Контрольные вопросы

1. Уточнить порядок действий при работе с иммерсионной системой микроскопа:

- А. Опустить столик, снять препарат, протереть фронтальную линзу объектива
- Б. Нанести на препарат каплю иммерсионной жидкости и закрепить предметное стекло на столике микроскопа
- В. Глядя в окуляр, осторожно погружать объектив в иммерсионную жидкость с помощью макровинта, следя за появлением изображения
- Г. Глядя сбоку на препарат, поднимать предметный столик до «вспышки» (контакта объектива с каплей иммерсионной жидкости)
- Д. Навести резкость изображения микровинтом

2. Почему при изучении живых клеток под световым микроскопом не используют режим светлого поля?



3. Указать, какая мембрана принадлежит грамотрицательным, а какая – грамположительным бактериям. Вписать названия основных компонентов клеточной стенки.

Подпись преподавателя _____

Измерение размеров микроскопических объектов

Задачи

1. Ознакомиться с объект-микрометром и калибровать окуляр-микрометр.

2. Измерить размеры клеток бактерий в препарате «раздавленная капля» с помощью микрометра.

3. Освоить компьютерную программу «Видео-Тест Размер 5.0» для автоматической морфометрии исследуемых чистых микробных культур.

4. Определить размеры клеток на фиксированных окрашенных мазках с помощью автоматической визуализирующей системы микроскопа.

Введение

Определить размеры микроорганизмов не так просто, как может показаться. Предварительно в поле зрения микроскопа должны быть установлены оптические устройства, называемые окуляр-микрометр и объект-микрометр (рис. 1 А, Б). Размеры

микроорганизмов определяют с помощью фазово-контрастного устройства в живой 24-часовой культуре, выращенной в жидкой среде. Культуры такого возраста имеют более или менее однородные клетки, характерные для изучаемого вида. У кокков измеряют диаметр, у других форм – длину и ширину клетки. Единицей измерения является микрометр ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм}$). Микроорганизмы измеряют с помощью окулярной линейки – окуляр-микрометра (рис. 1 А).

Окуляр-микрометр представляет собой вмонтированную в окуляр круглую стеклянную пластинку с выгравированной в центре линейкой, разделенной на 100 или более частей. Цену деления его линейки устанавливают с помощью объект-микрометра (рис. 1 Б).

Объект-микрометр – стеклянная пластинка с выгравированной в центре шкалой длиной 1 мм, разделенной на 200 частей. Следовательно, одно деление шкалы объект-микрометра соответствует 0,005 мм или 5 мкм.

Практическая работа

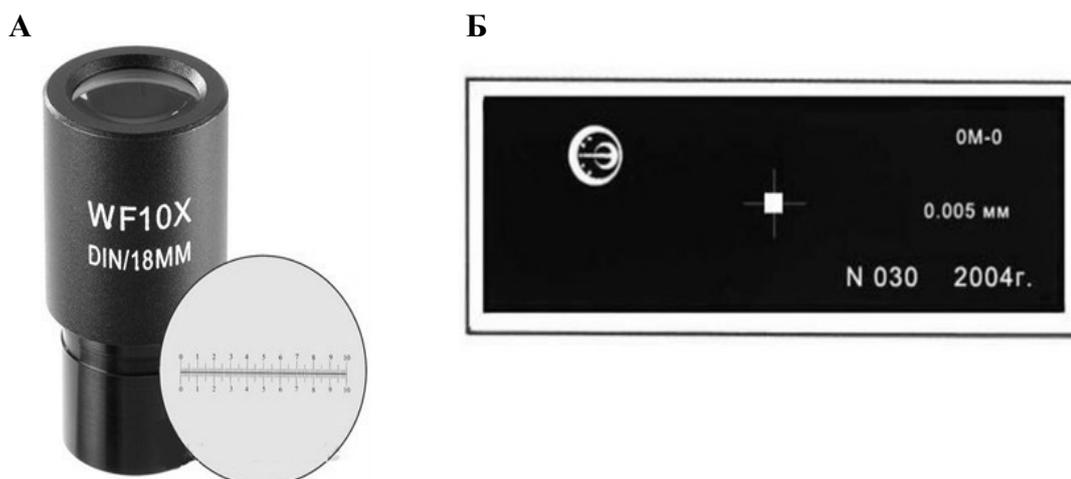


Рис. 1. Микрометры: А – окуляр-микрометр; Б – объект-микрометр

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Фиксированные препараты и нативные чистые культуры бактерий из Коллекции ИЭГМ. Предметные и покровные

стекла. Бактериологическая петля. Спиртовая горелка. Окуляр-микрометр. Объект-микрометр. Микроскоп с автоматической системой визуализации.

Определение цены деления окулярного микрометра

Процедура

А. Объект-микрометр установить на столик микроскопа и сфокусировать при увеличении объектива 10х.

Б. Изображение линейки переместить в центр поля зрения и сменить объектив на тот, при котором будут определяться размеры микроорганизмов.

В. Установить линейки обоих микрометров параллельно и совместить их первые деления (метки «0»).

Г. По принципу нониуса найти следующее совмещение черт и определить, сколько делений объект-микрометра соответствует одному делению окуляр-микрометра (рис. 2).

Пример. 20 делений объект-микрометра соответствуют 10 делениям окулярного микрометра ($20 \times 5 \text{ мкм} = 100 \text{ мкм}$), значит, цена одного деления окуляр-микрометра равна $100 : 10 = 10 \text{ мкм}$. Заменяют объект-микрометр препаратом и при том же увеличении измеряют исследуемый объект. Если измеряемая клетка занимает в длину 2,0, а в ширину 0,5 деления окуляр-микрометра, ее размеры будут равны: длина $2 \times 10 = 20 \text{ мкм}$; ширина $0,5 \times 10 = 5 \text{ мкм}$.

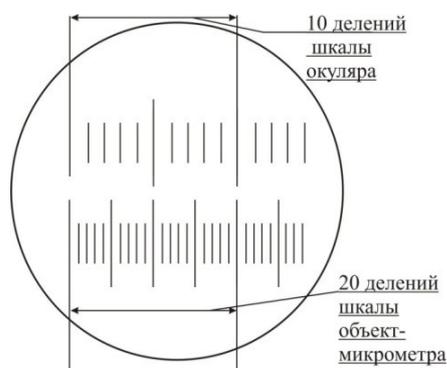


Рис. 2. Определение цены деления окуляр-микрометра

Наблюдения и результаты

1. Определить значения цены деления окулярного микрометра для некоторых комбинаций окуляров и объективов. Заполнить таблицу.

Окуляр	Объектив	Общее увеличение	Цена деления окулярного микрометра, мкм
10х	5х		
10х	10х		
10х	40х		
10х	100х		

2. Выполнить измерения не менее 20–30 клеток (для достоверности результатов) в препаратах «раздавленная капля» под микроскопом и указать их средние размеры, заполняя таблицу.

Культура бактерий	Длина микроорганизмов, мкм			
	Измерения в единицах окулярного микрометра (увеличение микроскопа _____)	Среднее значение	Цена деления окулярного микрометра, мкм	Размер, мкм

Культура бактерий	Ширина микроорганизмов, мкм			
	Измерения в единицах окулярного микрометра (увеличение микроскопа _____)	Среднее значение	Цена деления окулярного микрометра, мкм	Размер, мкм

3. Измерение микроорганизмов под микроскопом с помощью автоматизированной системы визуализации (прилож. 1, рис. 11П).

Компьютерная программа «ВидеоТест Размер 5.0» позволяет проводить линейные и угловые измерения, работать с таблицей результатов измерений, выводить данные статистической обработки и сохранять результаты измерений.

Процедура

А. Получить изображения фиксированных окрашенных препаратов исследуемых культур с помощью цифровой камеры микроскопа и программы «ВидеоТест Размер 5.0».

Б. Открыть изображение клеток исследуемой культуры из каталога *Images*.

В. Создать *Таблицу* и произвести замеры длины, ширины, угла соединения клеток и других параметров. При этом в нижней части таблицы автоматически отображаются данные статистической обработки.

Г. Сохранить файл с изображением и таблицей измерений.

Д. Составить и распечатать *Отчет*.

Контрольные вопросы

1. Является ли *цена деления окулярной линейки* величиной постоянной и независимой от кратности увеличения объектива? Поясните.

Подпись преподавателя _____

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Определение способности бактерий использовать углеводы, спирты и органические кислоты

Задачи

1. Ознакомиться с основными принципами идентификации микроорганизмов.
2. Освоить методы определения биохимических свойств микроорганизмов.
3. Идентифицировать до вида бактериальные штаммы *Rhodococcus* spp. по физиолого-биохимическим признакам.

Введение

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание способности расти на разных питательных средах, вызывая те или иные превращения веществ, входящих в состав этих сред. Чаще всего изучают проявление внутри- и внеклеточной ферментативной активности – использование углерода, азота и серы, способности расщеплять крахмал, белки и липиды. Важно определить отношение к факторам среды – молекулярному кислороду, температуре, солености, рН среды, освещенности.

Среди прочих признаков определяют антибиотическую активность и чувствительность микроорганизмов к антибиотическим

веществам и др. Как правило, физиолого-биохимические признаки необходимы для идентификации и установления систематического положения различных представителей бактерий, в том числе актинобактерий рода *Rhodococcus*.

Для идентификации большинства гетеротрофных микроорганизмов необходимо определить, какие углеводы, спирты и органические кислоты обеспечивают рост изучаемого организма и какими изменениями среды сопровождается его рост.

Так, под действием микробных ферментов углеводы и спирты расщепляются до разнообразных промежуточных продуктов в зависимости от субстрата, условий культивирования и вида организма (рис. 1). Конечными продуктами их расщепления являются CO_2 и H_2O . Индикатор среды – бромкрезоловый пурпурный – при ферментации углевода (спирта) и выделении кислоты меняет окраску с фиолетового на желтый, что свидетельствует о способности бактерий сбраживать данный углевод (спирт). Учитывая изменение рН среды, можно оценить глубину ферментативного процесса (прилож. 1, рис. 15П).

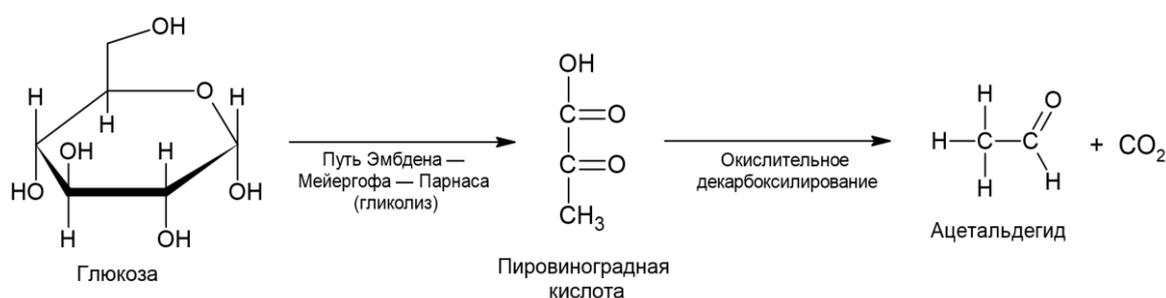


Рис. 1. Схема расщепления глюкозы с образованием пировиноградной кислоты и последующим её декарбоксилированием до ацетальдегида и углекислого газа

Об использовании микроорганизмами органических кислот судят по образованию щелочных продуктов метаболизма и изменению реакции среды (рН). Для этого в диагностическую среду добавляют индикатор – феноловый красный, который меняет окраску со светло-желтого до розового (прилож. 1, рис. 15П).

Такие физиолого-биохимические признаки, как образование кислоты из углеводов и использование органических кислот в совокупности с макроморфологическими свойствами, являются важным диагностическим критерием бактерий рода *Rhodococcus* (см. табл. 1).

Весьма информативными при идентификации являются тесты на способность

родококков гидролизовать эскулин (рис. 2), проявлять уреазную и нитратредуктазную активность (прилож. 1, рис. 16П).

Так, организмы, продуцирующие β-глюкозидазу, гидролизуют эскулин, высвобождая эскулетин. Последний, в свою очередь, реагирует с ионами железа, образуя черный осадок (прилож. 1, рис. 16П А, Б).

Определение данных биохимических реакций проводится в стерильных 96-луночных полистироловых культуральных микропланшетах с использованием готовых наборов согласно протоколу производителя (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия) и набора реагентов для идентификации бактерий API® Coryne (Biomérieux, Франция) (прилож. 1, рис. 17П).

Табл. 1. Дифференцирующие признаки представителей *Rhodococcus* spp.

Признак	<i>R. fascians</i>	<i>R. rhodochrous</i>	<i>R. ruber</i>	<i>R. erythropolis</i>	<i>R. opacus</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.
<i>Цвет колоний</i>						
оранжево-красный	–	+	+	–	–	
розовато-красный	–	+	–	–	–	
желтый	+	–	–	–	–	
палево-бежевый	–	–	–	+	+	
<i>Образование кислоты из</i>						
арабинозы	+	–	–	–	–	
галактозы	+	–	–	–	–	
ксилозы	н.д.	–	–	–	н.д.	
инозита	–	–	–	+	+	
сорбита	н.д.	+	+	+	н.д.	
мальтозы	–	–	–	–	+	
сахарозы	+	–	+	+	+	
<i>Усвоение натриевых солей кислот</i>						
винной	–	–	–	–	+	
лимонной	+	+	+	+	+	
молочной	+	+	+	+	+	
α-кетоглутаровой	+	+	–	–	+	
γ-аминомасляной	+	–	+	+	+	
бензойной	н.д.	–	+	–	н.д.	
янтарной	+	+	+	+	+	
<i>Разложение тирозина</i>	–	+	+	+	+	
<i>Наличие уреазы</i>	+	–	–	+	–	

Примечание. (+) – признак проявляется; (–) – признак не проявляется; (н.д.) – нет данных

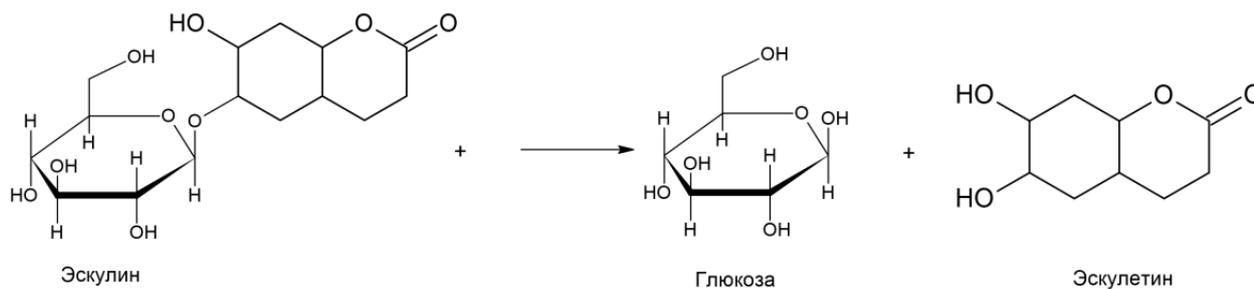


Рис. 2. Схема гидролиза эскулина

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Чистые культуры бактерий из Коллекции ИЭГМ и свежевыделенные изоленты. Колбы на 250, 2000 мл. Цилиндр мерный. Пробирки. Минеральные соли. Вода

дистиллированная. Красители. Контейнеры для взвешивания. Шпатель металлический. Спиртовая горелка. Петля бактериологическая. Автоматические пипетки. Весы технические. рН-метр. Автоклав. Термостат.

1. Приготовление физиологического раствора

Процедура

А. Приготовить 20 пробирок с 0,5%-ным р-ром NaCl (по 5 мл). Общий объем раствора? _____ мл. Количество NaCl? _____ г.

Б. Закрывать пробирки пробками, упаковать и подготовить для стерилизации в автоклаве.

2. Приготовление диагностической среды для определения способности микроорганизмов использовать углеводы, глюкозиды и спирты (рис. 3)

Процедура

А. Налить в колбу 2700 мл дистиллированной воды.

Б. Рассчитать и приготовить смешанную навеску веществ (в одну колбу) для минеральной основы диагностической среды в расчете на 2700 мл. Добавить навеску в воду, хорошо перемешать.

Вещество	Количество вещества, г	
	на 1000 мл	на 2700 мл
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,0	?
KCl	0,2	?
MgSO ₄	0,2	?

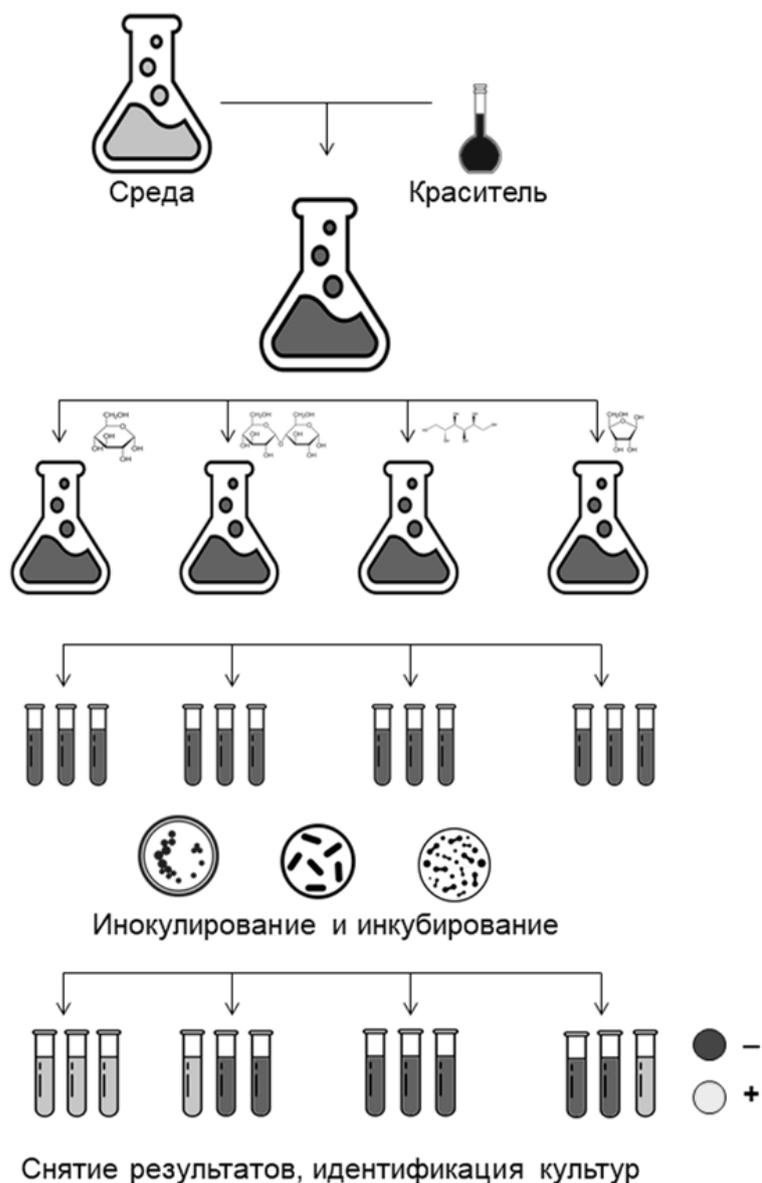


Рис. 3. Схема проведения эксперимента по определению способности микроорганизмов использовать углеводы, глюкозиды и спирты

В. Довести рН минеральной основы до 6,8–7,0 с использованием 1N HCl.

Г. Приготовить 0,04%-ный водный раствор индикатора (бромкрезоловый пурпурный) и добавить его в среду из расчета 15 мл на 1000 мл минеральной основы. Необходимый объем индикатора рассчитывается в за-

висимости от вносимого количества красителя в минеральную основу диагностической среды.

Д. Рассчитать и приготовить сухие навески углеводов в отдельных колбах на конечный объем 300 мл среды каждая (из расчета 10 г на 1000 мл среды).

Раствор минеральной основы, мл	Готовый раствор индикатора, мл
1000	15
2700	?

Вещество	Количество г на 1000 мл	Количество г на 300 мл
Глюкоза	10	?
Сахароза		
Мальтоза		
Инозитол		
Салицин		
Сорбитол		
Трегалоza		
Рибоза		
Галактоза		

Е. Добавить 300 мл минеральной основы среды с индикатором в каждую из 9 колб. Хорошо перемешать до растворения субстратов.

Ж. Готовые диагностические среды углеводами разлить по 5 мл в пробирки и стерилизовать автоклавированием при 0,5 ати.

3. Приготовление диагностической среды для определения способности микроорганизмов использовать органические кислоты

Процедура

А. Налить в две колбы по 900 мл дистиллированной воды.

Б. Приготовить две навески веществ минеральной основы диагностической среды в расчете на общий объем 1800 мл.

Вещество	Количество г на 1000 мл	Количество г на 1800 мл
В одну колбу		
NaCl	1,0	?
MgSO ₄	0,2	?
В другую колбу		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,0	?
KH ₂ PO ₄	0,5	?

В. Добавить к каждой навеске по 900 мл дистиллированной воды. Хорошо перемешать. После растворения солей объединить полученные растворы и снова перемешать.

Г. Добавить 0,04%-ный водный раствор индикатора – фенолового красного из расчета 20 мл на 1000 мл диагностической

среды. Необходимый объем индикатора рассчитывается в зависимости от вносимого количества красителя в минеральную основу диагностической среды.

Д. Рассчитать и приготовить сухие навески органических кислот в отдельных колбах на конечный объем 300 мл среды каждая (из расчета 2 г на 1000 мл среды).

Раствор минеральной основы, мл	Готовый раствор индикатора, мл
1000	20
1800	?

Вещество	Количество г на 1000 мл	Количество г на 300 мл
γ-Аминомасляная кислота	2	?
α-Кетоглутаровая кислота		
Бензойная кислота		
Уксусная кислота		
Пировиноградная кислота		
Фумаровая кислота		

Е. Добавить по 300 мл минеральной основы среды с индикатором в каждую из 6 колб. Хорошо перемешать до растворения субстратов.

Ж. Готовые диагностические среды углеводами разлить по 5 мл в пробирки и стерилизовать автоклавированием при 0,5 ати.

4. Проведение микробиологического посева

Процедура

А. Подписать пробирки с 0,5 %-ным р-ром NaCl в соответствии с номерами штаммов.

Б. Приготовить бактериальную взвесь в 0,5 %-ном р-ре NaCl по Стандарту мутности БАК5 ($0,5 \times 10^8$ клеток/мл).

В. Провести посев исследуемых культур в диагностические углеводные среды и параллельно в среды с солями органических кислот. В каждую пробирку внести по 100 мкл взвеси.

Г. Культивировать в течение 7–28 сут при температуре 28 °С.

Наблюдения и результаты

1. Визуально по культуральным признакам (помутнение среды, образование пленки) отметить рост или его отсутствие во всех использованных средах.

2. Фиксировать изменение цвета индикатора.

Образование кислоты отмечать по изменению цвета индикатора от пурпурного (рН среды 6,8) до желтого (рН 5,2).

Об усвоении кислот судить по изменению цвета индикатора от желтого (рН 6,6–6,8) до розового (рН 8,4).

3. Определить способность изолятов гидролизовать эскулин, проявлять уреазную и нитратредуктазную активность с использованием готовых наборов реагентов для постановки тестов. Отметить: (+) – признак проявляется; (–) – признак не проявляется. Заполнить табл. 2.

4. Снять результаты определения физиолого-биохимических особенностей штаммов через 7, 14, 21 день. Отметить: (+) – наблюдается изменение окраски среды; (–) – изменения окраски среды нет. Заполнить табл. 3.

Табл. 2. Проявление ферментативной активности родококков

Номер штамма / цвет колоний	Уреазная активность					Гидролиз эскулина					Нитратредуктазная активность				
	3 ч	1 сут	2 сут	3 сут	7 сут	3 ч	1 сут	2 сут	3 сут	7 сут	3 ч	1 сут	2 сут	3 сут	7 сут

Табл. 3. Проявление физиолого-биохимических признаков у штаммов родококков

Номер штамма / цвет колонии	Повторность	Галактоза	Мальтоза	Сорбитол	Рибоза	Глюкоза	Инозитол	Сахароза	Салицин	Трегалоза	γ-Аминомасляная кислота	α-Кетоглутаровая кислота	Бензойная кислота	Уксусная кислота	Пировиноградная кислота	Фумаровая кислота
7 сут																
	1															
	2															
	3															
	1															
	2															
	3															
14 сут																
	1															
	2															
	3															
	1															
	2															
	3															
21 сут																
	1															
	2															
	3															
	1															
	2															
	3															

5. Заполнить столбец «*Rhodococcus* sp.» в табл. 1 (см. с. 41), отмечая проявления дифференцирующих признаков у исследуемой культуры микроорганизмов.

6. Сравнить полученные данные с дифференцирующими признаками представителей отдельных видов *Rhodococcus*, используя ключ и диагностические таблицы видовой дифференциации родококков (см. табл. 1, рис. 4).

А



Б

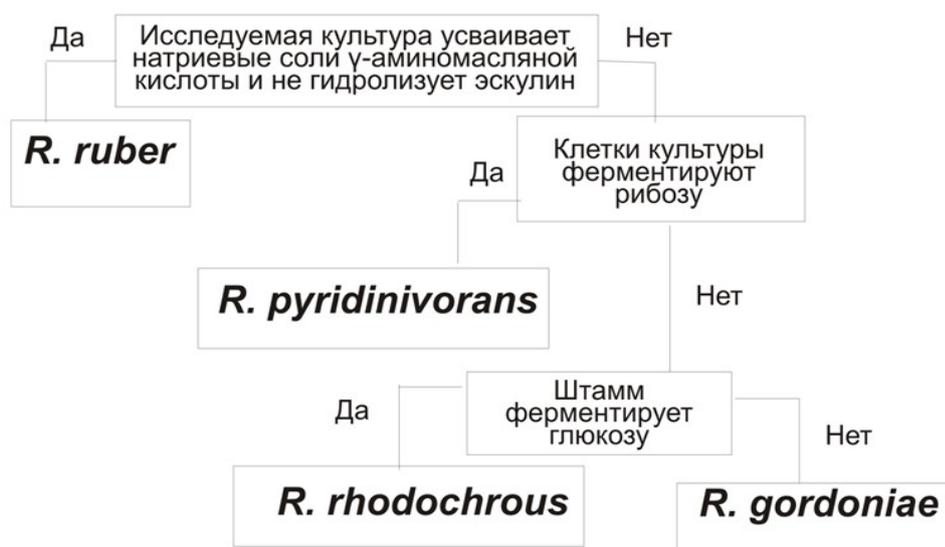


Рис. 4. Ключ для определения видов родококков с палево-телесным (А) и красно-оранжевым (Б) недиффундирующим пигментом

Заключение

Предварительно дифференцировать исследованные штаммы родококков по физиолого-биохимическим признакам

Штамм	Цвет колоний	Предположительные виды

Контрольные вопросы

1. Почему происходит изменение цвета среды с желтой на черную при гидролизе эскулина?
2. Некоторые микроорганизмы могут усваивать углеводы и наращивать биомассу, но изменения цвета диагностической среды не происходит. Почему?

Подпись преподавателя _____

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Определение способности актинобактерий использовать углеводороды

Задачи

1. Ознакомиться с микроорганизмами, способными к использованию углеводов.

2. Освоить луночный метод определения углеводородокисляющей активности актинобактерий.

Введение

Среди ряда представителей микромира, способных усваивать в качестве единственного источника углерода и энергии углеводороды, особо выделяются представители актиномицетной линии эволюции прокариотов –

актинобактерии рода *Rhodococcus*. Они занимают доминирующее положение в антропогенно нарушенных биотопах и характеризуются способностью разлагать широкий спектр углеводородных субстратов. В том числе: газообразные (C₂–C₄) и жидкие *n*-алканы, длинноцепочечные алифатические и ароматические углеводороды, нефтепродукты и другие трудно разлагаемые и токсические поллютанты. Выявить способность бактериальных культур окислять углеводороды можно с использованием агаризованной минерально-солевой среды «К» с добавлением индивидуальных углеводородов (прилож. 1, рис. 18П).

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Чистые культуры бактерий из Коллекции ИЭГМ. Минеральные соли. Вода дистиллированная. Индивидуальные углеводороды. Стандарт мутности БАК-5. Стерильные чашки Петри. Пробирки с 0,5%-ным водным р-ром NaCl. Петля бактериологическая. Пробочное сверло. Спиртовая горелка. Технические весы. Автоклав. Термостат.

1. Подготовка питательной среды

Процедура А. Приготовить 700 мл среды следующего состава (г/л): KNO₃ – 1,0; KH₂PO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; NaCl – 1,0; MgSO₄ – 0,2; CaCl – 0,02; FeCl₃ – 0,001; агар, BBL™ GRADE A (высококачественный агар без посторонних минералов) – 15,0; вода дистиллированная – 1000 мл. Почему используется агар высокой степени очистки?

Б. Разлить стерильную среду в чашки Петри толстым слоем. После того как среда застынет, в центре агаровой пластинки вырезать лунки, используя пробочное сверло (диаметр 8–10 мм). Сверло предварительно стерилизовать в пламени горелки.

В. Нанести с наружной стороны дна чашки стеклографом радиальные штрихи. Число образуемых секторов должно соответствовать числу испытуемых культур (см. рис. 1).

Г. Маркировать чашки Петри в соответствии с используемыми углеводородами и культурами микроорганизмов в 2-кратной повторности.

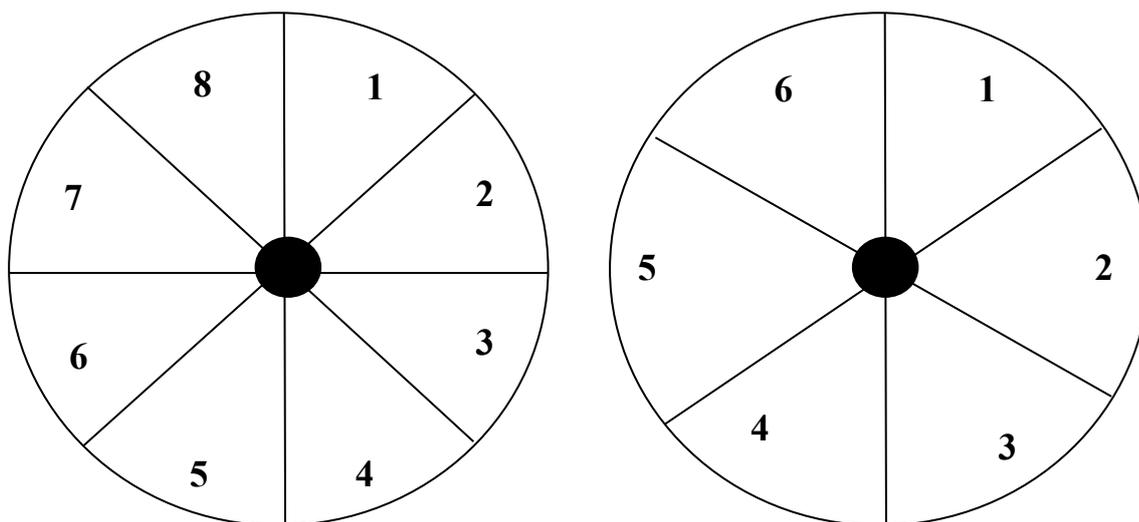


Рис. 1. Схема маркировки чашек Петри: 1–8 – сектор для посева исследуемых микроорганизмов; в центре – лунка для внесения жидкого углеводорода

2. Посев и культивирование

Процедура

А. В стерильный 0,5%-ный р-р NaCl внести петлей биомассу чистой культуры плотностью до 10^7 – 10^8 клеток/мл (по Стандарту мутности БАК-5) для получения суспензии.

Б. Суспензию каждой культуры высевать «зеркальцем» петли во все чашки, проводя штрихи по радиусу соответствующего сектора в направлении от лунки к периферии чашки.

В. В лунки внести 2–3 капли жидких углеводов (*n*-гексадекан, бутанол-1, *o*-ксилол, нефть), используя на каждый углеводород по две чашки (2-кратная повторность). В лунки еще двух чашек Петри углеводород не вносят. Рост культур на агаризованной среде в этих чашках служит контролем.

Г. Для добавления нафталина и фенола чашки Петри с посеянными культурами перевернуть вверх дном, приоткрыть и поместить углеводороды на крышку.

Д. Чашки Петри поместить строго горизонтально в соответствующие углеводороду эксикаторы и термостатировать при 28 °С. Продолжительность культивирования составляет 7 сут. Контрольные чашки культивировать отдельно. Почему?

Е. При изучении способности бактерий использовать пропан в качестве единственного источника углерода и энергии эксикатор заполняют газо-воздушной смесью (1:1). Культивирование проводят при температуре 28 °С в течение 14 сут.

⚠ Все операции по внесению углеводов проводить в перчатках в вытяжном шкафу. Глаза должны быть защищены очками.

Наблюдения и результаты

1. Интенсивность роста выделенных культур в присутствии каждого углеводорода оценивать визуально, пользуясь условными обозначениями: (+++) – обильный рост; (++) – средний рост; (+) – слабый рост; (–) – рост отсутствует. Результаты занести в табл. 1.

2. Сравнить полученные результаты с данными в контрольных вариантах на питательной среде без углеводорода.

3. Сделать вывод о доступности используемых в работе углеводов для бактериальных культур. Отметить штаммы, способные активно использовать индивидуальные углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии.

Табл. 1. Рост исследованных культур на среде с углеводородами

№ п/п	Штамм	Углеводороды							
		Контроль культуры	Пропан	<i>n</i> -Гексадекан	Бутан-1-ол	О-Ксилол	Фенол	Нафталин	Нефть
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

Заключение

Контрольные вопросы

1. Какой метод и тип среды используют для выявления способности микроорганизмов усваивать жидкие нелетучие углеводороды?

2. Характеризовать физиолого-биохимические особенности микроорганизмов – это значит:

Подпись преподавателя _____

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Установление типа свободных миколовых кислот у корине- и нокардиоформных актинобактерий

Задачи

1. Ознакомиться с основными принципами хемотаксономического анализа бактериальных штаммов на уровне рода и вида.

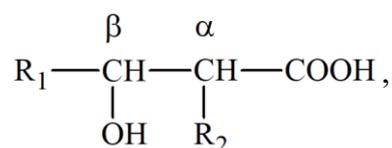
2. Определить тип свободных миколовых кислот (липид LCN-A) методом тонкослойной хроматографии метанолизатов целых клеток актинобактерий.

3. Осуществить предварительную идентификацию изолятов с учетом хемотаксономических и морфологических критериев.

Введение

Хемотаксономия играет исключительно плодотворную роль в систематике и идентификации тех групп прокариотных организмов (актинобактерий, в частности), у которых морфологические и физиологические характеристики широко варьируются. В основе хемотаксономического анализа лежит изучение «хемотипа клеточной стенки», обнаружение «свободных миколовых кислот», «свободных жирных кислот», «фосфолипидов» и др. Метод выявления свободных миколовых кислот, называемых липид LCN-A (Lipid Characteristic of Nocardia), позволяет дифференцировать микобактерии, истинные нокардии, родококки и коринебактерии путем анализа спиртово-эфирных клеточных экстрактов на тонкослойных хроматограммах. Липид LCN-A представляет собой комплекс свободных миколовых кислот (числом до 15), экстрагируемых спиртово-эфирной смесью, в отличие от миколовых кислот истинных микобактерий, экстрагируемых хлороформом.

Миколовые кислоты различаются по длине, числу двойных связей и заместителей, а по строению представляют собой высокомолекулярные алфа-разветвленные жирные бета-гидрокислоты с двумя алкильными радикалами:



где R_1 и R_2 – алкильные радикалы.

Высокомолекулярные миколовые кислоты микобактерий характеризуются числом углеродных атомов от 60 до 98. Нокардии синтезируют миколовые кислоты с 45–58 атомами углерода, большинство родококков – с 35–50, коринебактерии – с 20–36 атомами углерода.

Тест LCN-A помогает разграничить трудно дифференцируемые культуры, имеющие IV тип клеточной стенки. Так, липид LCN-A определенного типа («calcareo», «rhodochrous», «gordonia»), выявляемый у родококков, коринебактерий и нокардий имеет на хроматограммах неодинаковое расположение пятен. Более высокое значение коэффициента разделенных метилмиколатов (R_f) имеет липид, изолируемый из нокардий, ниже всех – из коринебактерий, а промежуточное положение занимают миколовые кислоты из родококков (см. рис. 1).

Дифференцирование актинобактерий некоторых видов, обладающих способностью к синтезу свободных миколовых кислот, возможно путем сопоставления хемотаксономических (по типу липида LCN-A) и фенотипических (по цвету колоний) признаков (см. табл. 1).

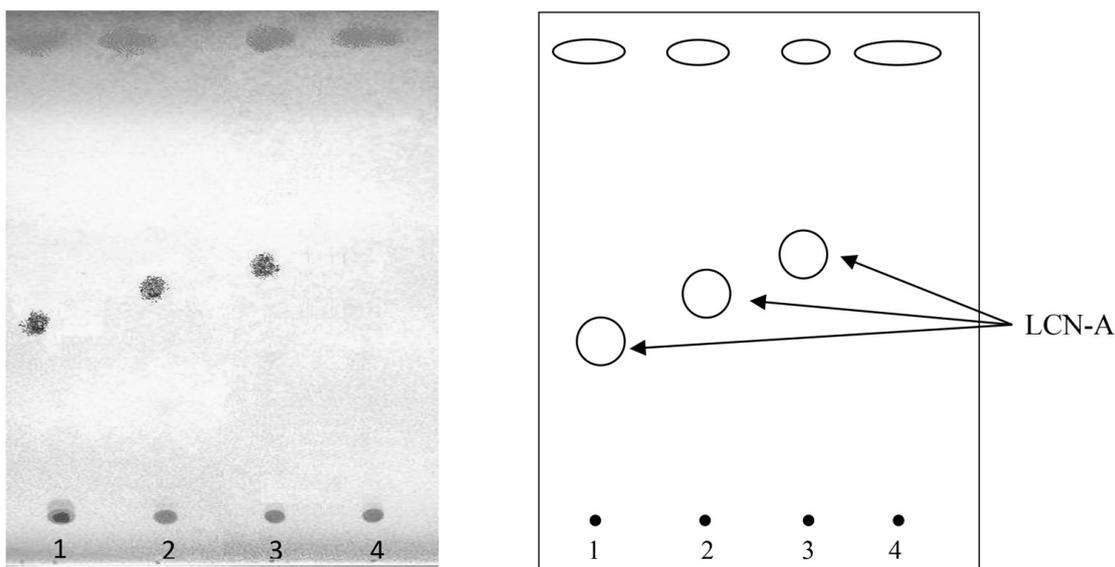


Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма метанолизатов целых клеток актинобактерий: 1 – *Corynebacterium glutamicum* ИЭГМ 1861; 2 – *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70^T; 3 – *Nocardia farcinica* ИЭГМ 621; 4 – *Mycobacterium imperiale* ИЭГМ 827

Табл. 1. Идентификация *Rhodococcus* spp. и родственных им актинобактерий по комплексу хемотаксономических и морфологических критериев

Липид LCN-A типа	Цвет колоний		
	Палевый	Красный	Желтый
«calcarea»	<i>R. erythropolis</i> <i>R. globerulus</i> <i>R. koreensis</i> <i>R. qingshengii</i>	<i>Dietzia maris</i> <i>R. pyridinivorans</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
«rhodochrous»	<i>R. jostii</i> <i>R. maanshanensis</i> <i>R. opacus</i> <i>R. wratislaviensis</i> <i>R. zopfii</i>	<i>R. corynebacterioides</i> <i>R. rhodnii</i> <i>R. rhodochrous</i> <i>R. ruber</i>	<i>R. fascians</i> <i>R. kyotonensis</i> <i>R. yunnanensis</i>
«gordonia»	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Gordonia amarae</i> <i>G. terrae</i> <i>G. rubripertincta</i>	<i>N. farcinica</i>

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Метанолизаты целых клеток коллекционных штаммов актинобактерий и свежывыделенных изолятов. Реагенты хромато-

графической системы. Тонкослойные хроматографические пластинки типа Silufol UV 254 (150x150 мм, «Merck», Германия). Стекло-вая хроматографическая камера. Стекло-вые

капилляры объемом 1,0 мкл (ООО «Прецизионное стекло», Россия). Пинцет. Простой карандаш. Линейка. Защитные очки.

В работе используют приготовленные заранее метанолизаты целых клеток, полученные из сухой биомассы; хроматографическую систему (петролейный эфир – диэтиловый эфир в соотношении 85:25); проявляющий реактив (10%-ный раствор фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле).

Процедура

А. Составить план нанесения анализируемых образцов на хроматографическую пластинку. Для этого на расстоянии 1,5 см от нижнего края силуфольной пластинки определить линию старта. Карандашом отметить место нанесения опытных образцов на линии старта точками через 1,5 см друг от друга.

Б. 5 мкл исследуемого образца нанести капилляром на подготовленную пластинку в несколько приемов в одну и ту же точку, тщательно высушивая пластинку на воздухе или с помощью вентилятора перед каждым последующим нанесением образца. Размер пятна не должен превышать в диаметре 10 мм.

В. В стеклянную хроматографическую камеру поместить фильтровальную бумагу

(для лучшего насыщения парами растворителей). Залить в камеру приготовленную перед разделением систему растворителей, смачивая фильтровальную бумагу. Закрывать плотно стеклянной крышкой и в течение часа насыщать камеру парами растворителя.

Г. Хроматограмму с нанесенными образцами поместить в предварительно насыщенную парами растворителей камеру и герметично закрыть. После подъема фронта растворителя на высоту 13,5 см хроматограмму удалить из камеры и высушить до полного испарения растворителя. Повторить процедуру три раза.

Д. Для проявления пятен миколовых кислот пластинку опрыскать 10%-ным раствором фосфорно-молибденовой кислоты и нагреть в сушильном шкафу при 105 °С.

⚠ Все операции проводить в вытяжном шкафу в резиновых перчатках. Глаза должны быть защищены очками. Особую осторожность проявлять при работе со стеклянными микрокапиллярами и агрессивными реагентами. Рабочий стол следует дезинфицировать до начала работы и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3,0%-ный водный раствор хлорамина.

Наблюдения и результаты

Пятна свободных миколовых кислот располагаются между стартовой линией и дополнительно выявляемыми на хроматограмме пятнами не идентифицированных жирных кислот (прилож. 1, рис. 19П).

1. Дать схематическое изображение полученной тонкослойной хроматограммы (рис. 2).

Рис. 2. Схематическое изображение полученной тонкослойной хроматограммы

2. Рассчитать коэффициент распределения R_f для миколовых кислот, пользуясь формулой. Заполнить табл. 2.

$$R_f = X : X_1,$$

где X – расстояние, пройденное веществом от точки старта до середины каждого пятна, см (измерить с помощью линейки);

X_1 – расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы от линии старта до линии фронта растворителя в момент окончания процесса хроматографирования, см (измерить с помощью линейки).

Табл. 2. Расчет коэффициента распределения R_f свободных миколовых кислот (липид LCN-A) в метанолизатах целых клеток

Исследуемый штамм	Расстояние, см		Значение R_f
	Старт-фронт растворителя	Старт-липид LCN-A	

3. Определить тип свободных миколовых кислот (липид LCN-A) на основании сравнения R_f новых изолятов с R_f типовых штаммов актинобактерий:

Rhodococcus erythropolis ИЭГМ 7^T – тип «calcarea»;

Rhodococcus ruber ИЭГМ 70^T – тип «rhodochrous»;

Gordonia rubripertincta ИЭГМ 95^T – тип «gordonia».

Заполнить табл. 3.

4. С помощью диагностической табл. 1 идентифицировать исследуемые штаммы до вида на основании типа миколовых кислот и цвета колоний. Заполнить столбец «Предположительные виды» в табл. 3.

Табл. 3. Результаты предварительной идентификации свежевыделенных изолятов по комплексу хемотаксономических и морфологических критериев

Штамм	Цвет колоний	R_f	Тип миколовых кислот	Предположительные виды

5. Сделать заключение по результатам хемотаксономической идентификации свежесыведенных изолятов.

Заключение

Контрольные вопросы

1. В чем преимущество метода обнаружения свободных миколовых кислот (тест LCN-A) у актинобактерий при идентификации?

2. Укажите основные хемотаксономические признаки актинобактерий.

Подпись преподавателя _____

Определение чувствительности бактерий к антибиотическим веществам диско-диффузионным методом

Задачи

1. Ознакомиться с основными типами антибиотиков, их происхождением, строением, механизмом действия.
2. Исследовать антибиотикочувствительность бактериальных изолятов.
3. Идентифицировать изоляты бактерий на основе компьютерного анализа их антибиотикограмм.

Введение

Антибиотики – вещества биогенного происхождения, обладающие выраженной физиологической активностью в отношении микроорганизмов. В малых количествах они избирательно задерживают рост (бактериостатическое или фунгистатическое действие) или вызывают их гибель (бактерицидное или фунгицидное действие) микробных культур.

В молекулах антибиотиков представлены практически все функциональные группы и структуры, известные в органической химии. Это могут быть азотсодержащие гетероциклические соединения, имеющие в своем составе β-лактамное кольцо (пенициллины, цефалоспорины); аминокликозиды, содержащие аминсахара и шестичленные циклы (неомицин, канамицин А, гентамицин С); тетрациклины, включающие четыре конденсированных шестичленных кольца; макролиды, имеющие макроциклическое лактонное кольцо, к которому присоединены сахара (эритромицин А); ароматические соединения (хлорамфеникол) и т.д.

По механизму биологического действия антибиотики можно разделить на группы соединений, ингибирующих синтез компонентов клеточной стенки, целостность и функции мембран, синтез нуклеиновых кислот и

азотистых оснований, синтез белка, процессы дыхания и окислительного фосфорилирования.

Под антибиотикорезистентностью (антибиотикоустойчивостью) понимают способность микроорганизма противостоять действию антибиотика. Известны различные механизмы антибиотикорезистентности: ферментативная инактивация антибиотика, изменение конформации мишени, на которую действует антибиотик, система активного выброса антибиотика из клетки с помощью эффлюксных помп на стадии проникновения через цитоплазматическую мембрану, снижение проницаемости мембраны и т. д.

Данный признак широко используется в классификации бактериальных родов, идентификации клинических изолятов, характеристике потенциальных биопродуцентов антибиотических веществ. В основе принципа антибиотикотипирования лежит тест Кирби-Бауэра (Kirby-Bauer), основанный на способности антибиотических веществ диффундировать в агар, создавая концентрационный градиент вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиком. Если исследуемые бактерии чувствительны к данным антибиотикам, то вокруг дисков образуются круглые зоны отсутствия бактериального роста. Чем активнее антибиотик, тем больше зона отсутствия роста. Антибиотикоустойчивые культуры не образуют стерильных зон (прилож. 1, рис. 20П).

Для идентификации актинобактерий дискодиффузионным методом по их чувствительности к антибиотическим веществам используется компьютерная программа IDENTIFICATION. Видовая дифференциация бактериальных культур осуществляется на основе компьютерного анализа антибиотикограмм, в частности, по количественным показателям чувствительности к одному, двум или трем антибиотикам.

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Актинобактериальные штаммы из Коллекции ИЭГМ и свежевыделенные изоляты. Пробирки с 0,5%-ным р-ром NaCl. Чашки Петри с мясопептонным агаром. Бактериологическая петля. Автоматическая пипетка. Пинцет. Стеклянные шпатели. Бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Линейка. Термостат.

Процедура

А. Готовить однородные бактериальные суспензии в пробирках с 0,5%-ным р-ром NaCl.

Б. С помощью дозатора поместить 0,1 мл суспензии на поверхность МПА. Произвести засев сплошным газонем с помощью шпателя, поворачивая чашку Петри на 60° для равномерного распределения инокулята.

Процедуру повторить дважды (двукратная повторность).

В. Чашки Петри оставить при комнатной температуре на 15 мин для подсушивания и адсорбции клеток.

Г. На поверхность агаризованной среды с помощью пинцета поместить бумажные диски на равном расстоянии (2,5–3,0 см) друг от друга и на расстоянии 1,5–2,0 см от края чашки. На чашку диаметром 90 мм накладывать не более 5 дисков (рисунок). Диски необходимо плотно прижать к поверхности агара.

Д. Чашки выдержать при комнатной температуре для лучшей диффузии антибиотиков в толщу среды, а затем поместить в термостат при 28 °С на 2–3 сут.

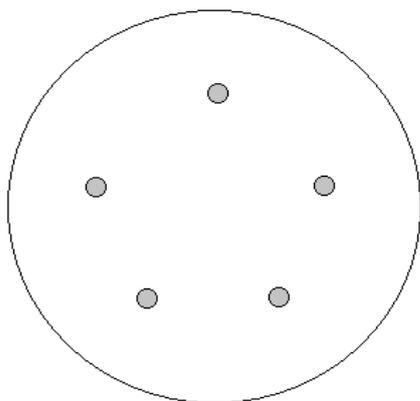


Схема расположения дисков с антибиотиками в чашке Петри

Наблюдения и результаты

1. Измерить диаметр зоны отсутствия роста культур с точностью до миллиметра. Заполнить сводную табл. 1.
2. Предварительно идентифицировать штаммы на основе анализа антибиотикограмм с использованием программы IDENTIFICATION и заполнить табл. 2.
3. Дать заключение по антибиотикочувствительности микроорганизмов к определенным антибиотикам, исходя из того:
 - что **высокочувствительные** культуры образуют зону отсутствия роста 25 мм и более,
 - чувствительные** – 15–25 мм,
 - малочувствительные** – 11–15 мм,
 - устойчивые** – менее 10 мм.

Табл. 2. Результаты определения видовой принадлежности исследованных актинобактерий

Номер штамма	Видовая принадлежность штамма

Заключение

Контрольные вопросы

1. Каковы критерии оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам по диско-диффузионному методу?

2. О чем свидетельствует отсутствие прозрачной (стерильной) зоны вокруг диска с антибиотиком?

Подпись преподавателя _____

Методы консервации живых культур микроорганизмов

Задачи

1. Ознакомиться с методами консервации микроорганизмов.
2. Освоить субстратное культивирование, осуществить осаждение клеток на диски фильтровальной бумаги и замораживание бактериальной суспензии актинобактерий.
3. Ознакомиться с процессом высушивания из замороженного состояния под вакуумом и подготовить культуры свежевыделенных изолятов к лиофилизации.

Введение

Постоянная и длительная работа с микроорганизмами в лабораторных условиях невозможна без правильного поддержания их в жизнеспособном состоянии с сохранением выявленных морфологических свойств, культуральных, физиолого-биохимических и генетических признаков. Существует множество методов торможения метаболической активности и перевода клеток в анабиотическое состояние, однако ни один из них не является универсальным, так как микроорганизмы разных систематических групп и даже отдельные штаммы различаются разной чувствительностью к консервации. Как показывает практика, одновременное использование нескольких методов хранения для поддержания микроорганизмов конкретной таксономической группы позволяет избежать их возможной потери под влиянием вероятности заражения культуры посторонней микрофлорой или потери исходной биохимической активности при хранении.

Краткосрочные методы хранения

Периодические пересевы. Осуществляются путем посева культур бактериальной петлей на свежую питательную среду с определенной временной частотой (прилож. 1, рис. 21ПЕ). Последующее хранение в холодильнике при температуре 4 °С приводит к снижению метаболической активности и

позволяет увеличить время между пересевами. Метод широко используется в практике лабораторий, т.к. доступен и прост в исполнении. Недостатки: опасность инфицирования посторонней микрофлорой, вероятность снижения биохимической активности и возникновения спонтанных мутантов.

Хранение в высушенном состоянии на адсорбентах. Метод связан с выведением воды из сферы метаболических процессов. Культуру высушивают при положительной температуре, используя в качестве носителей фильтровальную бумагу (прилож. 1, рис. 21ПБ), мембранные диски, кварцевый песок, стеклянные шарики, вату, силикагель и т.д. Это сравнительно простой метод, доступный для любой бактериологической лаборатории. Основан на способности бактерий, в частности представителей *Rhodococcus* spp., к адгезии, формированию цистоподобных форм в цикле развития и уникальной устойчивости их к естественному высушиванию.

Хранение в дистиллированной воде или 0,5%-ном р-ре NaCl. Метод относится к группе приемов, связанных с прекращением снабжения микроорганизмов питательными веществами. При этом бактериальные взвеси разливают по ампулам или пробиркам и герметично закупоривают.

Хранение под минеральным маслом. Фактором, уменьшающим скорость гибели бактериальных клеток при этом способе хранения, являются анаэробные условия, так как наложение на поверхность культуры минерального масла препятствует высыханию и диффузии в среду кислорода. Метод пригоден для культур, чувствительных к лиофилизации. Культуру выращивают на скошенном агаре и заливают вазелиновым маслом на 1 см выше края скоса среды, ограничивая тем самым доступ кислорода к культуре.

Долгосрочные методы хранения

Лиофилизация. Метод является одним из наиболее экономичных, эффективных и широко применяемых для длительного (в те-

чение 30 и более лет) хранения микроорганизмов в жизнеспособном состоянии (прилож. 1, рис. 21П А). Процедура лиофилизации заключается в удалении воды из замороженных бактериальных суспензий путем сублимации (переход вещества из твердого состояния в газообразное, минуя жидкую фазу) при низком давлении (прилож. 1, рис. 23П). Вакуум необходим для быстрого отвода водяного пара. Метод позволяет получить биопрепарат без потери структурной целостности и биологической активности. Предполагает использование криопротекторов для защиты клеток.

Криоконсервация. Способ замораживания и хранения при низких и сверхнизких

температурах с использованием различных криопротекторов (глицерин, ДМСО), предотвращающих повреждения клеток при заморозке (прилож. 1, рис. 21П В). Метод технически реализуется в морозильных камерах (от -20 до -85 °С) (прилож. 1, рис. 21П Г, Д) или в емкостях с жидким азотом (-196 °С). Имеет существенные преимущества перед лиофилизацией и высушиванием, такие как неограниченное время хранения культур, сохранение их высокой жизнеспособности, биохимической активности и генетической стабильности. В качестве недостатков метода необходимо отметить высокую стоимость оборудования и материалов.

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Штаммы из Коллекции ИЭГМ и свежевыделенные изоляты. Пробирки со скошенной питательной агаром. Криопротекторы: СЖА – сахарозо-желатиновый агар по Файбичу; 20%-ный раствор глицерина. Стерильные диски фильтровальной бумаги диаметром 6 мм. Стерильная дистиллированная вода. Стерильные стеклянные пробирки. Стерильные пластиковые криопробирки типа

«Simport» на 2 мл. Стерильные двойные стеклянные ампулы. Петля бактериологическая. Спиртовая горелка. Углеводороды (*n*-пропан, *n*-гексадекан). Автоматические пипетки. Микровстряхиватель для пробирок. Термостат. Морозильник сверхнизких (-86 °С) температур («MDF-U4086S» с системой «Backup CVK-UB2», SANYO, Япония). Лиофилизатор (Alpha 1-2 LD, Германия). Сосуд Дьюара с жидким азотом. Автоклав.

1. Периодический пересев культур (субкультивирование)

Процедура

А. Маркировать пробирки для пересева.

Б. Снять часть биомассы исходной культуры со скошенной питательной среды стерильной бактериальной петлей. Перенести биомассу в пробирку со свежей средой

методом штриха. Повторить процедуру дважды.

В. Культивировать микроорганизмы в пробирках 5–7 сут при 28–30 °С в термостате, затем поместить на хранение в холодильник при 4–6 °С.

2. Хранение бактерий на дисках фильтровальной бумаги

Процедура

А. Приготовить густую бактериальную взвесь в пробирке со стерильной дистиллированной водой или 0,5%-ным р-ром NaCl.

Б. Равномерно распределить стерильные диски по дну чашки Петри и смочить их небольшим количеством суспензии (1–3 мл) с помощью пипетки.

В. Поместить чашку Петри в термостат (28–30 °С) до полного высушивания дисков (2–3 нед.).

Г. Соблюдая стерильность, переложить диски с помощью пинцета в криопробирки и заложить материал на хранение в холодильник при 4 °С и/или -85 °С.

3. Криоконсервация чистых культур алканотрофных бактерий

Процедура

А. Вырастить культуру бактерий до стационарной фазы роста на скошенном МПА либо минерально-солевой среде «К» с углеводородами в качестве единственного источника углерода.

Б. Готовить густую бактериальную взвесь в дистиллированной воде путем снятия биомассы с агаризованной питательной среды и последующей гомогенизации суспензионной жидкости на микровстряхивателе.

В. Смешать полученную бактериальную взвесь со стерильным 20%-ным глицерином в объемном соотношении 1:1 для получения конечной концентрации криопротектора 10%.

Г. После 15-минутной эквilibрации суспензию разлить по 1,5–2,0 мл в маркированные криопробирки и поместить их в пластиковые криобоксы с ячейками.

Д. Замораживание и последующее хранение чистых культур осуществлять при $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильнике сверхнизких температур.

4. Лиофилизация чистых культур алканотрофных бактерий

Процедура

А. Вырастить культуру бактерий до стационарной фазы роста на скошенном МПА либо минерально-солевой среде «К» с углеводородами в качестве единственного источника углерода.

Б. Готовить густую бактериальную взвесь в дистиллированной воде путем снятия биомассы с агаризованной питательной среды с последующей гомогенизацией суспензионной жидкости на микровстряхивателе.

В. Смешать полученную бактериальную взвесь с протектором СЖА (1:1) в пустой стерильной пробирке. После 15-минутной эквilibрации суспензию разлить по 0,2 мл в стерильные стеклянные ампулы, маркированные на нижней части каждой ампулы.

Г. Замораживание чистых культур осуществлять путем погружения ампул с культурой в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Д. Замороженные ампулы поочередно присоединять к резиновым патрубкам на колонну лиофилизатора при глубине вакуума не менее 0,12 mBar и высушивать в течение 24–30 ч.

Е. По окончании сушки ампулы запаять под вакуумом с помощью газовой горелки непосредственно на лиофилизаторе. Хранить в холодильнике при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

⚠ Восстановление культур осуществляют путем регидратации или оттаивания с последующим высевом на питательные среды и подсчетом выросших колоний (КОЕ). При этом выживаемость микроорганизмов определяют в процентах по отношению к числу жизнеспособных клеток до начала хранения. Культуры, высушенные на бумажных дисках, восстанавливают путем наложения последних на поверхность плотной питательной среды (прилож. 1, рис. 22П).

Наблюдения и результаты

Указать преимущества и недостатки используемых методов хранения музейных культур на примере бактерий рода *Rhodococcus*, заполнив табл. 1.

Табл. 1. Сравнительная характеристика методов хранения бактерий

Методы хранения микроорганизмов	Преимущества	Недостатки	Допустимые сроки хранения
Периодические пересевы			
Хранение под минеральным маслом			
Хранение на адсорбентах (бумажные диски)			
Лиофилизация			
Криоконсервация (-85 °С)			

Контрольные вопросы

1. Что применяют в качестве адсорбентов при высушивании микроорганизмов?

2. Как влияет температура хранения микроорганизмов на число пересевов при субкультивировании?

Подпись преподавателя _____

Учет микрофлоры в воздухе закрытых помещений

Задачи

1. Ознакомиться с методами изучения микрофлоры воздуха.

2. Оценить степень обсемененности воздуха помещений по седиментационному методу.

Введение

С микробиологической точки зрения воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться, так как в нем нет питательных веществ и влаги, а солнечные лучи оказывают бактерицидное действие. Тем не менее в воздухе постоянно присутствуют пигментообразующие кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов. Микробная загрязненность воздуха имеет непостоянный характер и зависит от многих факторов. Воздух помещений загрязняется во время сухой уборки, чихания и кашля. Скорость оседания капель зависит от диаметра аэрозоля. Методы отбора проб воздуха для бактериологического исследования подразделяют на аспирационные, основанные на активном просасывании воздуха с помощью различных приборов, и седиментационные, основанные на принципе механического оседания микробов.

Аспирационный метод с использованием прибора Кротова является более точным, так

Практическая работа

Материалы, оборудование. Чашки Петри с мясопептонным агаром. Термостат.

Микробиологический анализ микрофлоры воздуха

Процедура

А. Поставить открытые чашки Петри с агаризованной питательной средой в двух точках исследуемого помещения (посевной

как прибор снабжен микроманометром, показывающим количество (объем) литров посеянного воздуха. Принцип работы этого аппарата основан на том, что воздух, просасываемый через клиновидную щель в крышке аппарата, ударяется о поверхность питательной среды. При этом частицы пыли и аэрозоля прилипают к среде в чашке Петри, а вместе с ними и микроорганизмы, находящиеся в воздухе.

Седиментационный (лат. *sedimentum* – осадок) метод (по Коху) не обладает большой точностью, но благодаря простоте и доступности широко распространен. Суть метода заключается в осаждении микробных частиц и капель аэрозоля на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести. Для пересчета количества микробов на 1 м^3 пользуются формулой В.Л. Омелянского. При этом правилом Омелянского подразумевается, что на поверхности агара в чашке Петри площадью 100 см^2 за 5 мин из воздуха оседает такое количество микробов, которое находится в 10 л воздуха ($1:100 \text{ м}^3$). Если применять чашки одного диаметра при одном сроке экспозиции, то этот метод может быть использован для получения сравнительных данных по бактериальному загрязнению воздуха помещений.

О степени загрязненности воздуха судят в конечном итоге по количеству колоний микроорганизмов, выросших на агаризованной питательной среде (прилож. 1, рис. 24П).

бокс, химический бокс, кабинет, учебная комната, коридор) на 5–15 мин (для определения общей обсемененности воздуха) и на 40 мин (для учета кокковой флоры).

Б. После экспозиции чашки закрыть, перевернуть (вверх дном) и поместить в термостат. Посевы инкубировать в термостате при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, а затем 1 сут при комнатной температуре.

Наблюдения и результаты

1. Подсчитать количество колоний микроорганизмов, выросших на агаризованной среде в чашке Петри, полагая, что каждая колония развивается из одной колониеобразующей единицы (КОЕ).

2. Определить количество микробов в 1 м^3 воздуха (микробное число) с учетом формулы Омелянского:

$$X = A \times 100 \times 1000 \times 5 : S \times 10 \times t,$$

где X – количество микроорганизмов в 1 м^3 (1000 л) воздуха; A – среднее количество выросших колоний в чашке; S – площадь поверхности питательного агара в чашке Петри, см^2 ; t – время экспозиции чашки Петри для определения общей обсемененности воздуха, мин; 5 – время Омелянского, мин; 10 – объем воздуха, л (по Омелянскому); 100 – площадь, см^2 (по Омелянскому); 1000 – искомый объем, л (1 м^3).

3. Заполнить таблицу с указанием обследованных помещений лаборатории.

Помещение. Время экспозиции, мин	Диаметр чашки, см	Площадь чашки, см^2	Среднее количество колоний	Микробное число воздуха, X

Пример расчета микробного числа. (Помещение – бокс; время экспозиции – 5 мин; количество выросших колоний – 2).

1. Рассчитываем площадь питательной среды в чашке Петри по формуле πr^2 :

$$3,14 \times 4,5^2 = 64 \text{ см}^2.$$

2. Если на площадь 64 см^2 за 5 мин осели 2 колониеобразующих единицы, то за это же время по правилу Омелянского на площадь 100 см^2 осело бы: $(2 : 64 \times 100) = 3 \text{ КОЕ}$. Это количество по правилу Омелянского содержалось бы в 10 л воздуха.

3. Соответственно рассчитываем число КОЕ, содержащихся в 1000 л (1 м^3) воздуха:

$$(3 : 10 \times 1000) = 300 \text{ КОЕ}.$$

4. Сделать расчет по своим данным.

Контрольные вопросы

1. Почему высеивают на плотные питательные среды и седиментационный анализ в микробиологии называют методом Коха?

Подпись преподавателя _____

Подсчет клеток под микроскопом в камере Горяева

Задачи

1. Ознакомиться с устройством камеры Горяева.

2. Определить количество бактериальных клеток после длительного хранения в криоконсервированном состоянии с помощью камеры Горяева.

Введение

Камера Горяева – устройство для подсчета клеток или иных соизмеримых с ними частиц в заданном объеме жидкости. Состоит из толстого предметного стекла, разделенного бороздками. Центральная часть стекла содержит прямоугольное углубление (камеру) глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесены две микроскопические сетки (рис. 1 А, Б). Сетка камеры содержит 225

больших квадратов. Часть из них разграфлена на малые квадраты (рис. 1 В). Размеры большого квадрата сетки: $0,2 \times 0,2 \text{ мм} = 0,04 \text{ мм}^2$ ($1/25 \text{ мм}^2$). Размеры малого квадрата: $0,05 \times 0,05 \text{ мм} = 0,0025 \text{ мм}^2$ ($1/400 \text{ мм}^2$).

Чтобы избежать возможных ошибок при подсчете клеток следует соблюдать некоторые правила (рис. 2). Клетки подсчитывать в пяти больших квадратах, разделенных на малые, двигаясь по диагонали. При этом целесообразно придерживаться определенной последовательности подсчета: передвигаться из одного малого квадрата в другой по горизонтали, соблюдая *правило Егорова*. Оно гласит о том, что к данному квадрату относятся те элементы, что лежат в его пределах, не касаясь нанесенных линий, а также те клетки, что располагаются на верхней и левой сторонах квадрата. Те клетки, которые «касаются» нижней или правой стороны, при подсчете учитываться не должны.

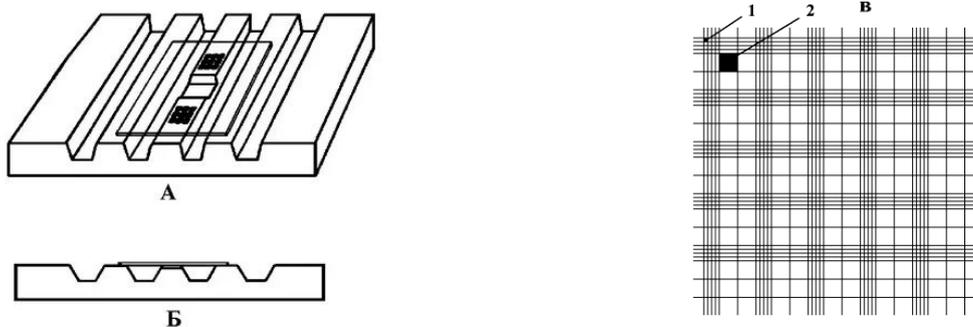


Рис. 1. Счетная камера Горяева: А – вид сверху; Б – вид сбоку; В – сетка камеры с выделением малого (1) и большого (2) квадратов

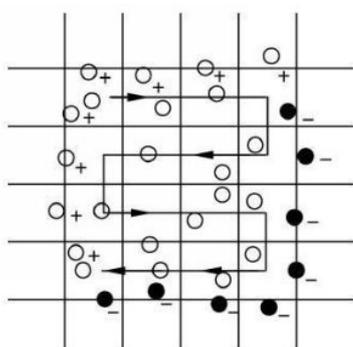


Рис. 2. Порядок подсчета клеток в камере Горяева

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Чистые бактериальные культуры из Коллекции ИЭГМ. Пробирки с 0,5%-ным р-ром NaCl. Камера Горяева. Автоматические пипетки. Микроскоп.

1. Подготовка культур к работе. Для количественного учета актинобактерий в камере Горяева пригодны жидкие бактериальные культуры актинобактерий в питательных средах (МПБ, минерально-солевая среда «К») или взвеси в 0,5%-ном р-ре NaCl, а также восстановленные после консервации коллекционные штаммы. В случае высокой плотности исходной суспензии рекомендуется использовать ее разведения до 1:10 клеток/мл.

2. Подготовка камеры Горяева. Рабочая поверхность камеры должна быть чистой и сухой. Покровное стекло очистить марлей, не используя спирта.

Процедура

А. Покрывать углубление камеры специальным шлифованным стеклом.

Б. Прижимая покровное стекло, смещать его в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что стекло притерто к сторонам камеры.

В. Заполнить камеру исследуемой суспензией пипеткой из разведения 1:10 через одну из двух центральных бороздок.

Г. Заполненную камеру поместить на столик микроскопа.

Наблюдения и результаты

Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3–5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и были видны в одной плоскости.

1. Установить объектив 10х. Найти изображение сетки камеры, затем установить объектив с увеличением 40х. С иммерсионным объективом не работать. Возможно использование фазового контраста.

2. Считать клетки в 10 больших или в 20 малых квадратах, двигаясь по диагонали или горизонтали, учитывая правило Егорова (см. рис. 2). Если число клеток слишком велико (больше 20 в большом квадрате), исходную суспензию развести водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 600. Подсчет клеток повторяют 3–5 раз, заново монтируя камеру и заполняя ее суспензией. Заполнить таблицу.

Число клеток в большом / малом квадрате (указать) камеры Горяева										Среднее

3. Рассчитать количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^3}{h \times S} \times n,$$

где M – количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии; a – среднее количество клеток в квадрате сетки; h – высота камеры, мм; S – площадь квадрата сетки, мм²; 10^3 – коэффициент перевода см³ в мм³; n – коэффициент разведения исследуемой суспензии.

$M =$ _____

4. Записать результат в виде ответа.

Ответ. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащееся в 1 мл суспензии культуры № _____, составляет _____ КОЕ / мл.

Контрольные вопросы

1. Какой объектив используют при подсчете бактериальных клеток в камере Горяева? Объясните почему.

2. Источником ошибок при подсчете бактериальных клеток в камере Горяева могут служить:

Подпись преподавателя _____

Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов

Задачи

1. Ознакомиться с прямыми и косвенными методами количественного учета микроорганизмов.

2. Освоить метод точечных высевов (МТВ) для определения численности жизнеспособных клеток.

3. Оценить жизнеспособность клеток чистых культур после длительного хранения в криоконсервированном состоянии методом точечных высевов.

Введение

Судить о количестве клеток в лабораторных средах или естественных субстратах можно с помощью как прямых (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание биомассы), так и косвенных методов (определение числа колоний при высеве суспензии

на плотные или жидкие среды, по содержанию белка в биомассе, по рассеиванию при прохождении света через суспензию и др.).

Методы высева позволяют оценить не столько количество, сколько жизнеспособность исследуемых культур. Среди прочих косвенных методов МТВ имеет ряд преимуществ, одним из которых является возможность существенно уменьшить количество используемой лабораторной посуды и питательных сред при полном сохранении достоверности получаемых результатов (прилож. 1, рис. 25П). Данный метод нашел широкое применение в практике восстановления (реактивации) лабораторных и коллекционных культур после длительного хранения в лиофилизированном и замороженном состоянии с последующим контролем их жизнеспособности.

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Штаммы бактерий из Коллекции ИЭГМ. Чашки Петри с мясопептонным

агаром. Пробирки с 0,5%-ным р-ром NaCl. Автоматические пипетки. Спиртовая горелка.

1. Восстановление замороженной чистой культуры бактерий

Замороженную суспензию оттаивать при комнатной температуре. Криопробирку в месте откручивания крышки обработать 70%-ным этиловым спиртом. Открыть крышку,

соблюдая стерильность, тщательно перемешать содержимое пипеткой и использовать для высева на питательные среды.

2. Микробиологический посев

Процедура

А. Приготовить ряд десятикратных разведений исходной суспензии согласно схеме (см. рис. 1).

Б. Маркировать чашки Петри к посеву. Для этого на донце чашки со стерильной питательной средой стеклографом нанести сетку (см. рис. 2). Отметить по 10 точек в секторе стеклографом для удобства посева. Написать номер штамма и разведение, из которого будет сделан посев в каждый сектор.

В. Автоматической пипеткой нанести точно 10 капель по 5 мкл исследуемой суспензии в каждый сектор из соответствующего разведения. Посев проводить в 20-кратной повторности, т.е. в два сектора по 10 капель из каждого разведения, два раза меняя наконечники.

Г. Чашки поместить в термостат при 28–30 °С и через стандартное время инкубации подсчитать результаты.

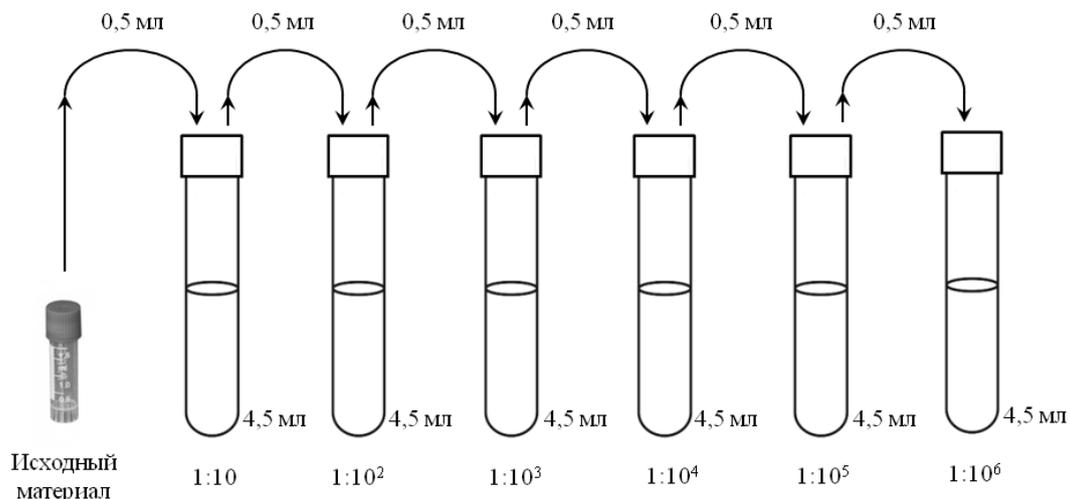


Рис. 1. Схема приготовления ряда десятикратных разведений исходного материала

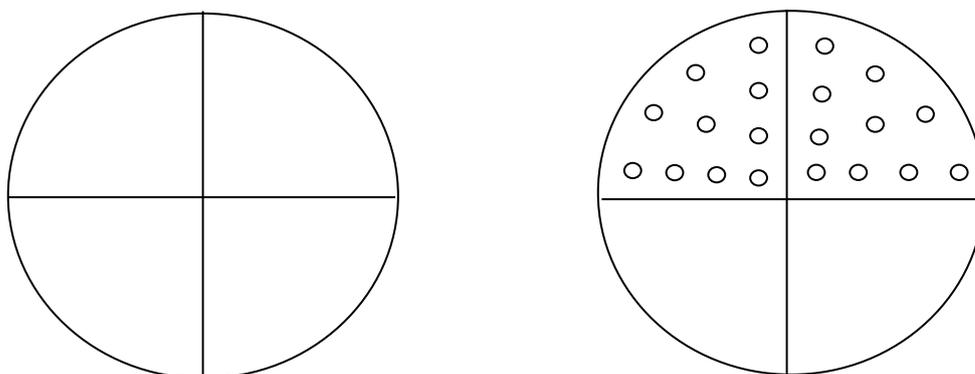


Рис. 2. Схема маркировки чашки Петри для посева

Наблюдения и результаты

Результаты можно учитывать как по числу колоний, выросших в 1 капле (I вариант), так и по числу капель, в которых наблюдается рост (II вариант).

I вариант расчётов

1. Произвести подсчет выросших микроколоний в каждой капле из данного разведения, отмечая их точкой с помощью маркера по наружной стороне дна чашки Петри.

2. Выписать в строчку все полученные значения числа колоний из разведения _____:

3. Занести данные в табл. 1, заполняя первые два столбца (значение признака и число встречаемости признака).

$S_{\bar{x}}$ – стандартное (среднее квадратичное) отклонение среднего арифметического, вычисляемое по формуле $S_{\bar{x}} = \delta / \sqrt{n}$ _____ ;

δ – средняя квадратичная ошибка отдельного измерения при $n < 30$, вычисляемая по формуле: $\delta = \sqrt{\sum P \times (x_i - \bar{x})^2 / n - 1}$ _____ ;

K – коэффициент (фактор) разведения суспензии, из которого сделан посев;

V – объем посевной капли.

7. Сделать расчет по своим данным:

$M =$ _____

8. Записать результат в виде ответа.

Ответ. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащееся в 1 мл исходной суспензии культуры № _____, составляет _____ КОЕ / мл.

II вариант расчётов

1. Подсчитать число капель, в которых наблюдается бактериальный рост без учета количества колоний в капле. Данные занести в табл. 2.

Табл. 2. Результаты посева культуры методом точечных высевов (по II варианту)

Разведение исходной суспензии	Количество капель, в которых наблюдается микробный рост (без подсчета числа колоний в капле)
10^{-4}	
10^{-5}	
10^{-6}	

2. Составить код из трех чисел. Первое число – соответствует количеству капель из разведения, где наблюдается микробный рост во всех 10 каплях, т.е. число 10.

Второе и третье числа – количество проросших капель из 10 в двух последующих разведениях.

Пример. Составлен код **10 5 2** из разведений 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} .

С помощью таблицы «Наиболее вероятного количества клеток микроорганизмов в единице объема исходной суспензии (по Мак-Креди)» находим наиболее вероятное число бактерий (НВЧ), соответствующее коду 10 5 2. Оно равняется 0,872. Это означает, что наиболее вероятное число клеток, содержащееся в 0,005 мл суспензии, взятой из разведения $1:10^5$, составляет **0,872**. Обозначим это число Y .

Далее пересчитываем число КОЕ на 1 мл исходной суспензии:

$$Y \times K \times 1 / V = 0,872 \times 10^5 \times 1 / 0,005 = 1,74 \times 10^7 \text{ КОЕ /мл.}$$

3. Записать код, составленный на основе экспериментальных данных _____
4. С помощью таблицы наиболее вероятных чисел (НВЧ) найти наиболее вероятное число бактерий (М), соответствующее коду _____

5. Рассчитать число КОЕ на 1 мл исходной суспензии культуры по формуле

$$M = Y \times K \times 1 / V =$$

6. Записать результат в виде ответа.

Ответ. Наиболее вероятное количество микроорганизмов, содержащееся в 1 мл исходной суспензии культуры № _____, составляет _____ КОЕ / мл.

Контрольные вопросы

1. В чем преимущества метода точечных высевок (МТВ) по сравнению с классическим методом посева на плотные питательные среды по Коху?

2. В чем разница между прямыми и косвенными методами учета?

Подпись преподавателя _____

Люминесцентный метод количественного определения клеток микроорганизмов

Задачи

1. Ознакомиться с принципом люминесцентной микроскопии и практикой использования люминесценции для оценки численности микробных культур.

2. Освоить экспресс-метод количественного учета бактерий путем дифференцированного окрашивания клеток реактивом LIVE/DEAD.

Введение

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света флуоресцировать, т.е. испускать лучи с другой, обычно большей, длиной волны. Такие вещества называют *флуорохромами*. Например, объект, обработанный *аурамином*, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает оранжевый цвет на черном или темно-зеленом фоне. Методы флуоресцентной микроскопии давно применяются в биологии, медицине, а также смежных областях. В частности, метод учета бактерий с помощью *флуоресцеин изотиоцианата* (FITC), описанный в 1970 г., используется до сих пор. Для выявления и более точного количественного учета микроорганизмов в естественных субстратах используют флуоресцирующий краситель *акридиновый оранжевый*. В настоящее время разработаны еще более совершенные красители, позволяющие быстро дифференцировать живые физиологически активные клетки и неживые, проводить их выявление и учет в одном препарате (прилож. 1, рис. 26П). Это наборы двухкомпонентных красителей

Практическая работа

Бактериальные культуры, материалы, оборудование. Коллекционные бактериальные культуры в лиофилизованном виде. 0,5%-

SYTO 9 / Propidium Iodide (реактив LIVE/DEAD).

Люминесцентный микроскоп – это обычный световой микроскоп, имеющий особый тип осветителя (ртутный, металлогалогенный, светодиодный) и ряд светофильтров, чтобы получить свет, вызывающий флуоресценцию того или иного красителя (прилож. 1, рис. 27П). Как правило, для возбуждения люминесценции объект освещают ультрафиолетовыми лучами длиной волны 300–400 нм или сине-фиолетовыми лучами длиной волны 400–460 нм. Первый люминесцентный микроскоп был предложен австрийскими учеными Ф.А. Кёллером (1857–1918) и Г.Ф. Зидентонфом (1872–1940) в 1908 г. Большой вклад в дело создания люминесцентных микроскопов в СССР внесли академик С.И. Вавилов и его ученики. Люминесцентная микроскопия имеет множество достоинств. Основным является возможность изучения живых клеток микроорганизмов с высоким разрешением – до 10 нм.

Методология люминесцентно-микроскопического метода достаточно проста. Клетку обрабатывают соответствующим химическим веществом. Происходит связывание этого вещества с определенными клеточными структурами. При освещении обработанной флуоресцирующим красителем суспензии клеток лучами соответствующей длины волны комплекс «клетка-краситель» начинает светиться. В результате клетка становится различимой для глаза под микроскопом или в проточном флуориметре.

В лабораторной и коллекционной практике метод применим для экспрессной оценки численности культур, реактивированных после долгосрочного хранения.

ный р-р NaCl. Набор флуоресцентных красителей Live/Dead® (Invitrogen™ Molecular Probes®, США). Спиртовая горелка. Сте-

рильные стеклянные пробирки. Стерильные пластиковые эппендорфы. Предметные и покровные стекла. Автоматические пипетки. Микровстряхиватель для пробирок.

Люминесцентный микроскоп Axio Imager M2 (Zeiss, Германия) с цифровой камерой и программой визуализации изображения Zen 3.1.

1. Восстановление бактерий после длительного хранения в лиофилизованном состоянии

Вскрыть ампулу, соблюдая стерильность. С помощью пипетки внести в ампулу 0,5–1,0 мл стерильного 0,5%-ного р-ра NaCl. Смешать компоненты пипеткой и перенести смесь в пустую стерильную пробирку для

регидратации. После 15–20 мин реактивации при комнатной температуре суспензия может использоваться для количественного анализа.

2. Приготовление препарата

Процедура

А. Приготовить разведение исходной суспензии 1:10.

Б. Смешать 10 мкл полученной взвеси с 10 мкл двухкомпонентного красителя LIVE/DEAD в стерильном пластиковом эппендорфе (соотношение 1:1). Оставить бактериальную взвесь в темном месте на 15 мин при комнатной температуре для окрашивания.

В. 5 мкл окрашенной бактериальной взвеси поместить на предметное стекло и накрыть покровным стеклом.

Г. Установить препарат на предметный столик для наблюдения под люминесцентным микроскопом с темнопольным конденсором (D). Использовать объектив с увеличением 100x и нефлуоресцирующее иммерсионное масло.

Наблюдения и результаты

1. Рассмотреть окрашенный препарат в микроскоп. С помощью цифровой камеры люминесцентного микроскопа сделать фото не менее 20 полей зрения, сохранив изображения в одну папку.

2. Последовательно открывая сделанные цифровые изображения из каталога *Images*, подсчитать клетки в каждом поле зрения, разделяя их на живые (флуоресценция зеленым цветом), мертвые (флуоресценция красным цветом) и частично поврежденные (флуоресценция желтым цветом).

3. Результат занести в таблицу.

Состояние клеток	Число клеток в поле зрения										Среднее
Живые											
Мертвые											
Частично поврежденные											

4. Рассчитать количество клеток в 1 мл исследованного материала по формуле

$$M = \frac{a \times F \times 10^6}{v \times s},$$

где a – среднее значение количества флуоресцирующих клеток; F – площадь покровного стекла, мм²; 10^6 – коэффициент перевода мм² в мкм²; v – объем капли; s – площадь просчитываемого поля зрения на экране монитора (129,94 × 100,24 мкм).

М (живые) = _____

М (мертвые) = _____

М (поврежденные) = _____

5. Рассчитать соотношение живых, мертвых и частично поврежденных бактериальных клеток (в процентах) от общей численности клеток, подсчитываемых под микроскопом.

Общее количество клеток _____, что составляет 100 %.

Количество живых _____, что составляет _____ %.

Количество мертвых _____, что составляет _____ %.

Количество частично поврежденных _____, что составляет _____ %.

6. Записать результат в виде ответа:

Ответ. Количество жизнеспособных клеток в 1 мл образца № _____ составляет _____, что соответствует _____ % от общего количества.

Контрольные вопросы

1. Рассчитать площадь поля зрения (S), видимую непосредственно в окуляры микроскопа, с использованием окулярной линейки, цена деления которой при увеличении объектива

100х = 1 мкм: $S = \pi r^2$ _____.

2. Почему подсчет клеток при люминесцентно-микроскопическом исследовании предпочтительнее производить, не глядя в окуляры микроскопа, а по цифровому изображению?

Подпись преподавателя _____

Рекомендуемая литература

- Веслополова Е. Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология. 1995. Т. 64, № 2. С. 279–284.
- Захарова Н. Г., Вершинина В. И., Ильинская О. Н. Микробиология в определениях и иллюстрациях. Казань: Изд-во «Фэн» Академии наук ТР, 2012. 799 с.
- Ившина И. Б. Большой практикум «Микробиология»: учеб. пособие. СПб.: Проспект Науки, 2014. 112 с.
- Ившина И. Б., Куюкина М. С., Каменских Т. Н., Криворучко А. В., Тюмина Е. А., Елькин А. А. Угледородоокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов: атлас-монография / под ред. И.Б. Ившиной. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 140 с.
- Методы общей бактериологии: пер. с англ. / под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.
- Милько Е. С., Егоров Н. С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации (корине- и нокардиоподобные бактерии). М.: Изд-во МГУ, 1991. 144 с.
- Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногина Т. М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Киев: Наукова думка, 1985. 336 с.
- Осипенко М. А., Няшин Ю. И., Куюкина М. С., Ившина И. Б. Идентификация непатогенных актинобактерий на основе анализа антибиограмм. Программный комплекс IDENTIFICATION. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2010615181. Зарегистр. в госреестре программ для ЭВМ 11.08.2010.
- Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студентов вузов / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms [Электронный ресурс] URL: <http://www.iegmccl.ru/strains/index.html> (дата обращения: 29.04.2022)
- Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology // Journal of bacteriology. 1990. V. 172, No. 2. P. 762–770.
- Methods in Microbiology. First edition. Vol. 38. Taxonomy of Prokaryotes / F. Rainey, A. Oren. (eds.). London: Elsevier Ltd., 2011. 484 p.

Иллюстрации материалов лабораторных работ

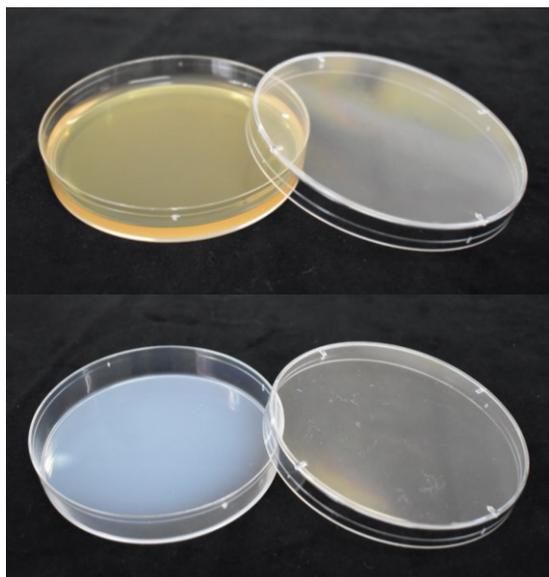


Рис. 1П. Плотные питательные среды в чашках Петри: мясопептонный агар (сверху) и минерально-солевая среда «К» (снизу). Занятие 1

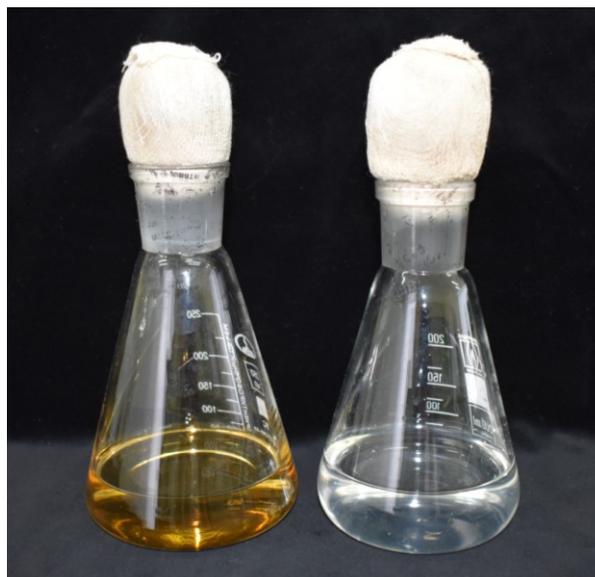


Рис. 2П. Жидкие питательные среды: мясопептонный бульон (слева) и минерально-солевая среда «К» (справа). Занятие 1



Рис. 3П. Анализатор влажности AND MX-50 (AND, Япония). Занятие 2

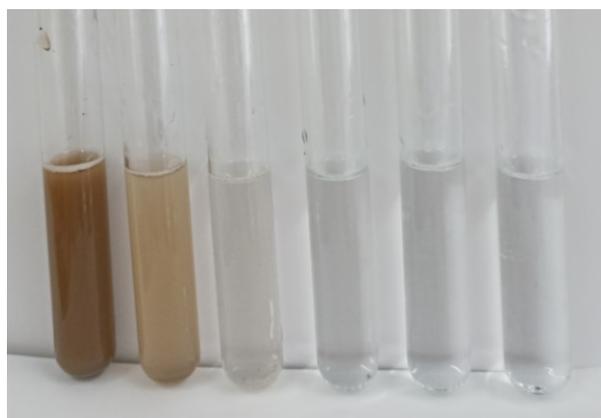


Рис. 4П. Ряд десятикратных разведений почвенной суспензии для количественного учета микроорганизмов в почве. Занятие 2



Рис. 5П. Культивирование микроорганизмов в стационарных условиях термостата. Занятие 2



Рис. 6П. Счетчик колоний микроорганизмов модели eCount™ (Heathrow Scientific, США). Занятие 2

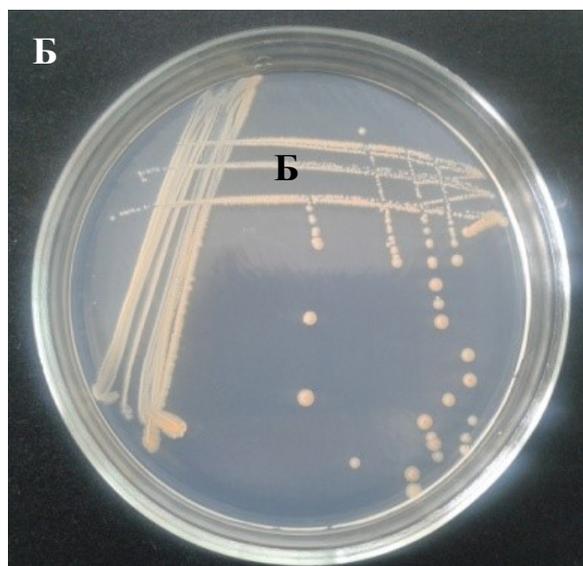
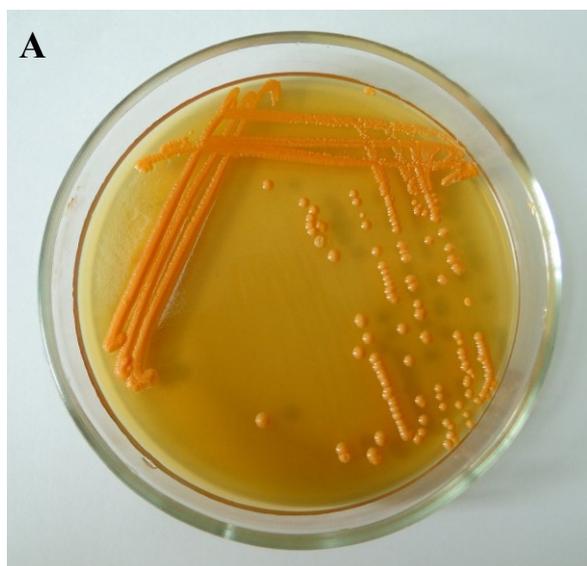


Рис. 7П. Изолированные колонии *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 235, полученные при рассеве бактериологической петлей (метод истощающего штриха): А – на мясопептонном агаре; Б – на минерально-солевой среде с *n*-гексадеканом. Занятие 3

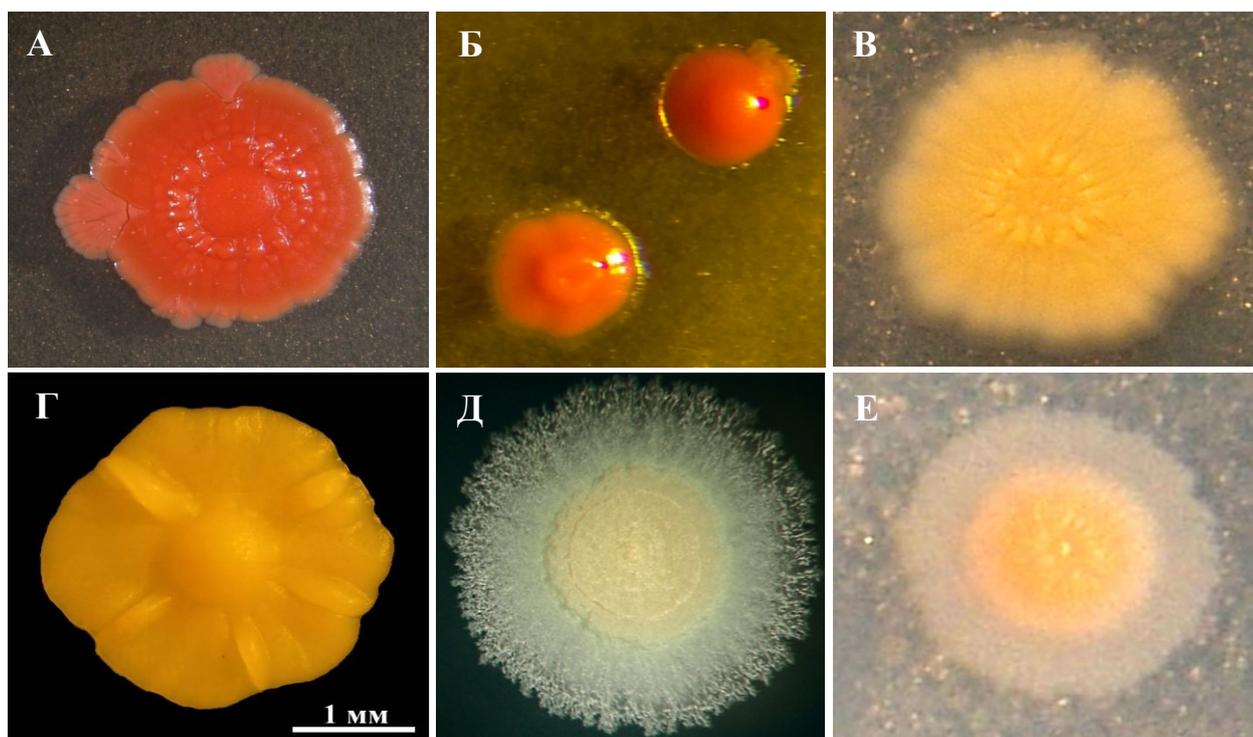


Рис. 8П. Колонии *Rhodococcus ruber* на мясопептонном агаре (А – штамм ИЭГМ 333, Б – ИЭГМ 71), на агаризованной минерально-солевой среде в присутствии *n*-гексадекана (В – ИЭГМ 235, Г – ИЭГМ 231), на агаризованной минерально-солевой среде в атмосфере пропана (Д – ИЭГМ 231, Е – ИЭГМ 333). Занятие 3

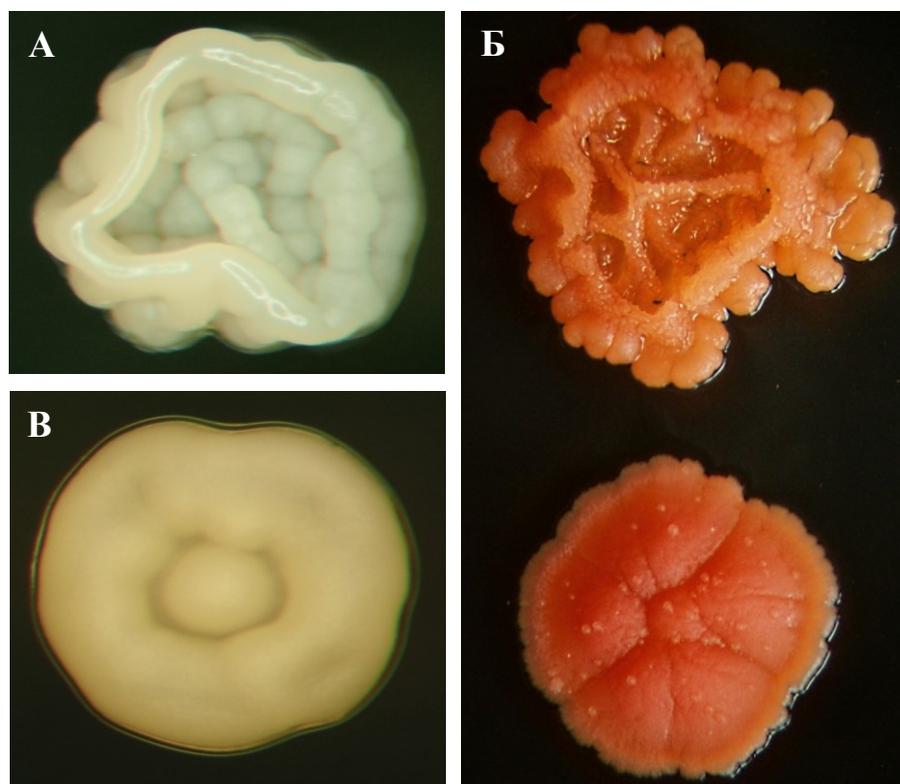


Рис. 9П. Колонии *Rhodococcus* spp. на мясопептонном агаре: А – *R. jostii* ИЭГМ 60; Б – *R. aetherivorans* ИЭГМ 1250; В – *R. wratislaviensis* ИЭГМ 1171. Занятие 3

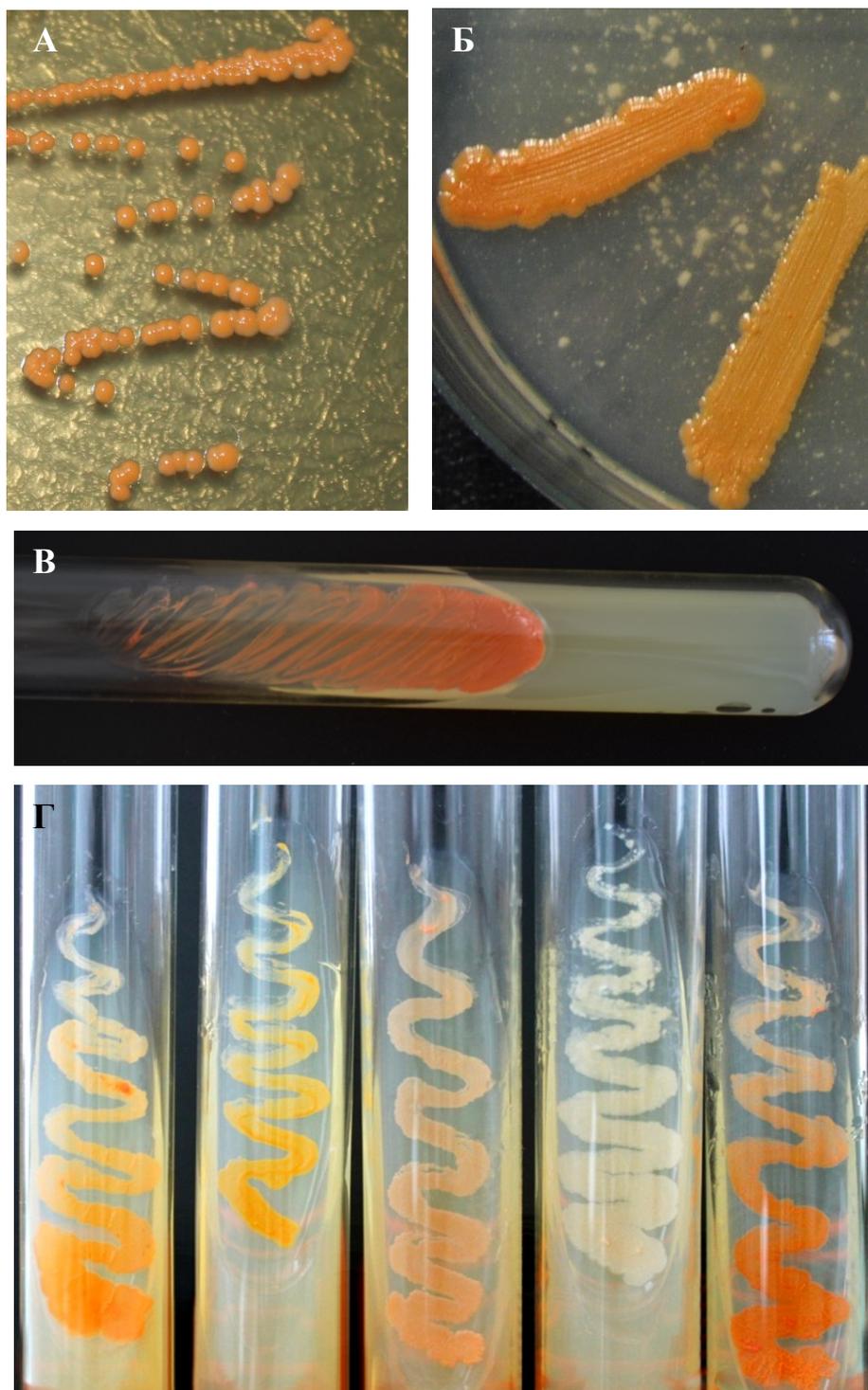


Рис. 10П. **Макроморфологическая характеристика отдельных представителей *Rhodococcus*:**
 А – округлые, выпуклые, оранжевого цвета колонии *R. ruber* ИЭГМ 72 с ровным краем, гладкой, блестящей поверхностью; Б – интенсивный с волнистым краем рост по штриху штаммов *R. ruber* ИЭГМ 72 и ИЭГМ 628 в присутствии холестерина; В – обильный сплошной рост *R. ruber* ИЭГМ 230 на скошенном мясопептонном агаре, Г – обильный сплошной рост по штриху *Rhodococcus* spp. на мясопептонном агаре. Занятие 3



Рис. 11П. Система анализа и обработки микроскопического изображения Axiostar plus (Carl Ziess, Германия) с программным обеспечением ВидеоТест-Размер 5.0 (ВидеоТест, Россия). Занятие 4, 6



Рис. 12П. Клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 716, окрашенные генциан-фиолетовым. Световая микроскопия. Занятие 5

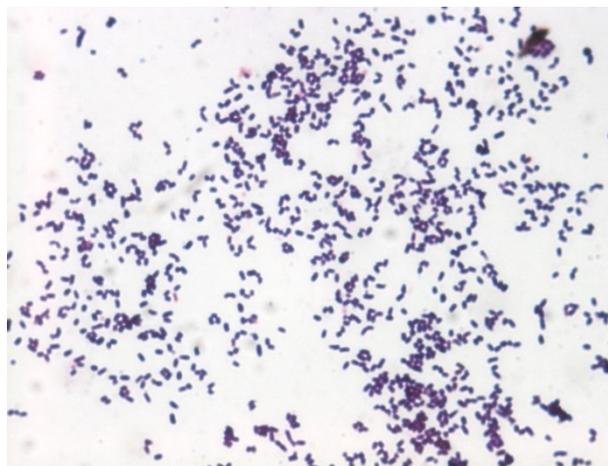
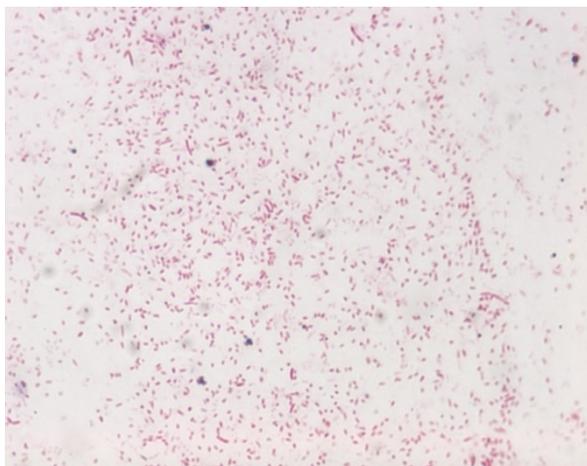


Рис. 13П. Окрашивание по Граму: А – грамотрицательные клетки *Rahnella aquatilis* (красное окрашивание); Б – грамположительные клетки *R. ruber* (синее окрашивание). Занятие 5

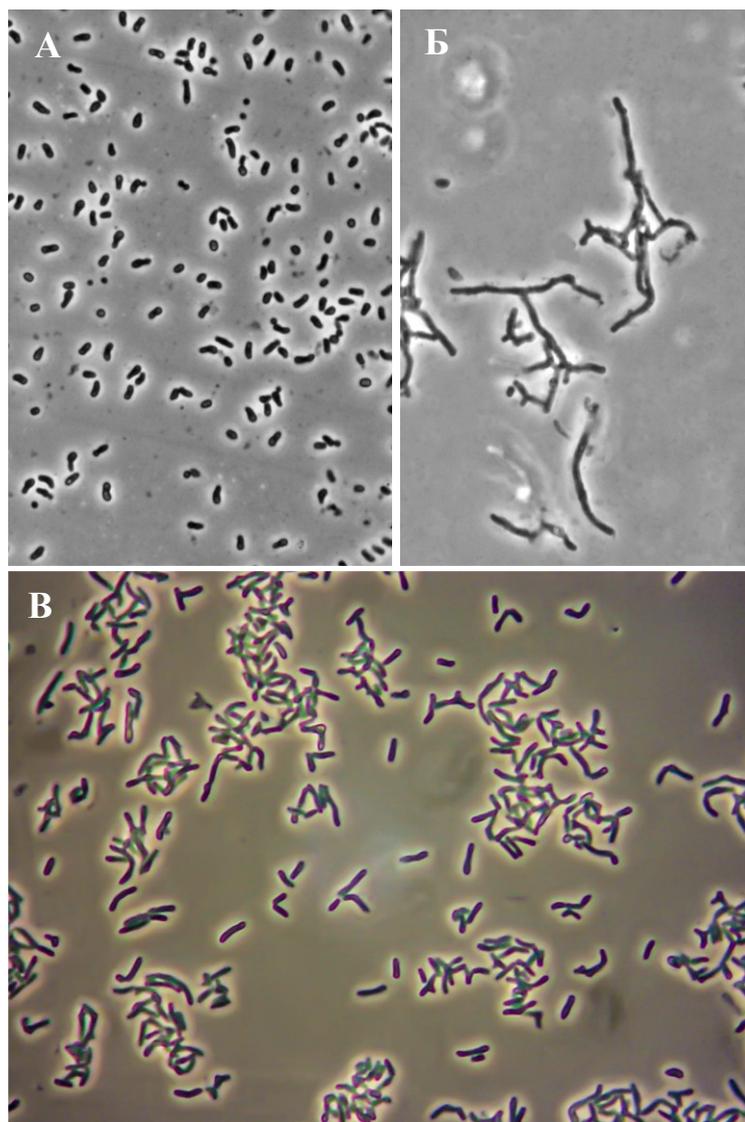


Рис. 14П. Морфология клеток *R. ruber*, выращенных на мясопептонном агаре: А – штамм ИЭГМ 381, 72 ч; Б – ИЭГМ 319, 18 ч; В – ИЭГМ 333, 12 ч. Фазово-контрастная микроскопия. Занятие 5

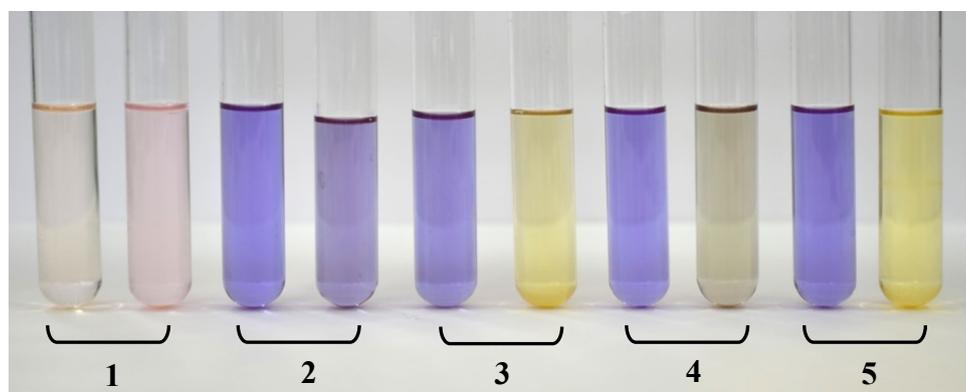


Рис. 15П. Физиолого-биохимическая активность *Rhodococcus* sp. ИЭГМ 2296 в отношении: гамма-аминомасляной кислоты (1), инозитола (2), глюкозы (3), рибозы (4), сахарозы (5). Пробирка слева – контроль диагностической среды. Занятие 7

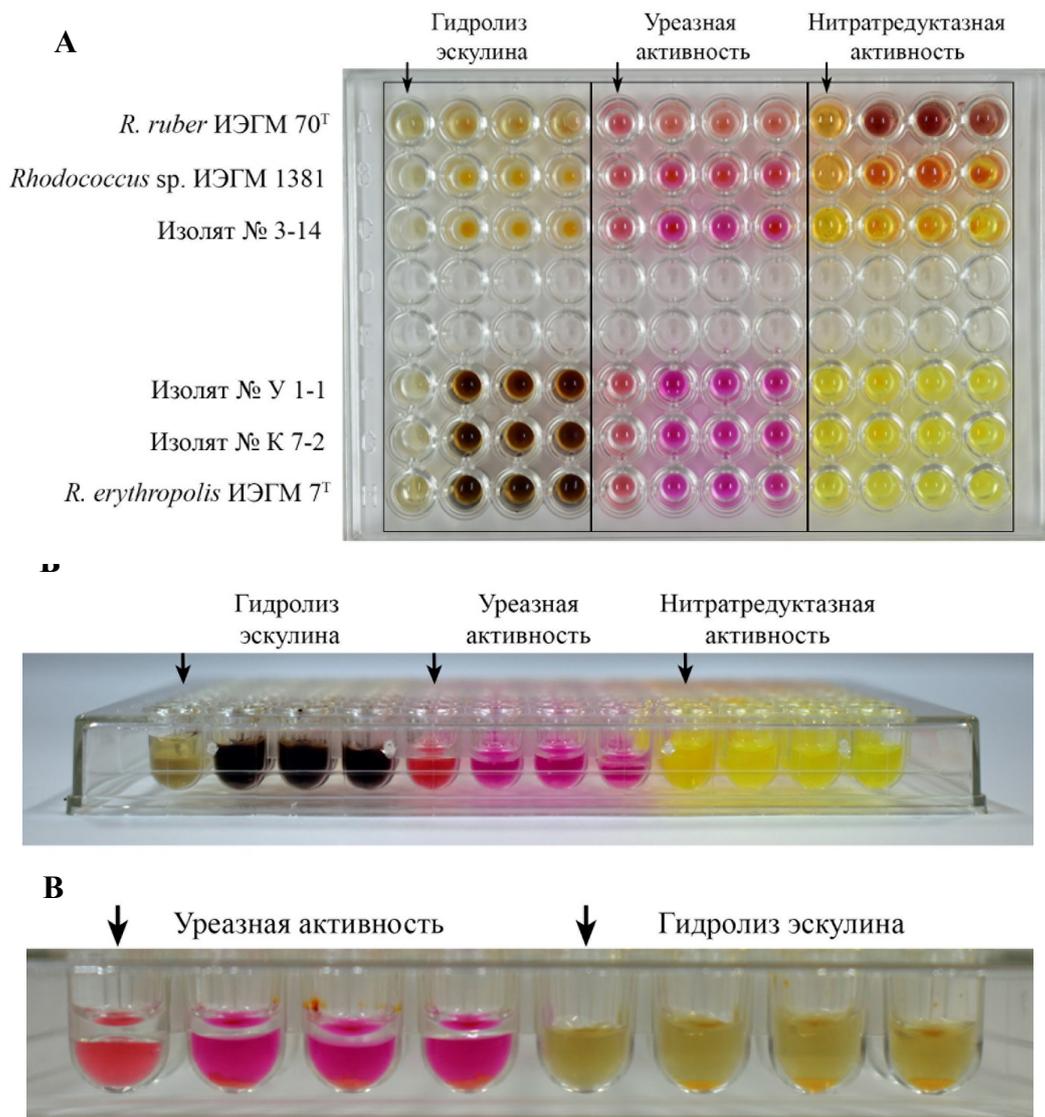


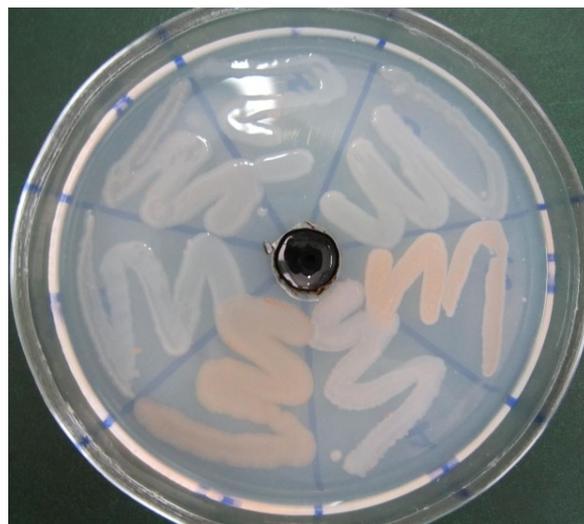
Рис. 16П. Физиолого-биохимические свойства свежевыделенных изолятов: способность гидролизовать эскулин, проявление уреазной и нитроредуктазной активности. А – общий вид планшета; Б – реакции типового штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 7^T; В – реакции свежевыделенного изолята (вид сбоку). Стрелками обозначен контроль субстрата. Занятие 7



Рис. 17П. Миниатюрный биохимический ряд API-системы (Biomérieux, Франция) для идентификации микроорганизмов. Занятие 7



Лабораторный ферментер



А



Б



В



Г

Д

Рис. 18П. Определение способности свежевыделенных изолятов актинобактерий использовать в качестве единственного источника углерода сырую нефть (А), *n*-гексадекан (Б), изобутанол (В), фенол (Г), ксилитол (Д). Занятие 8

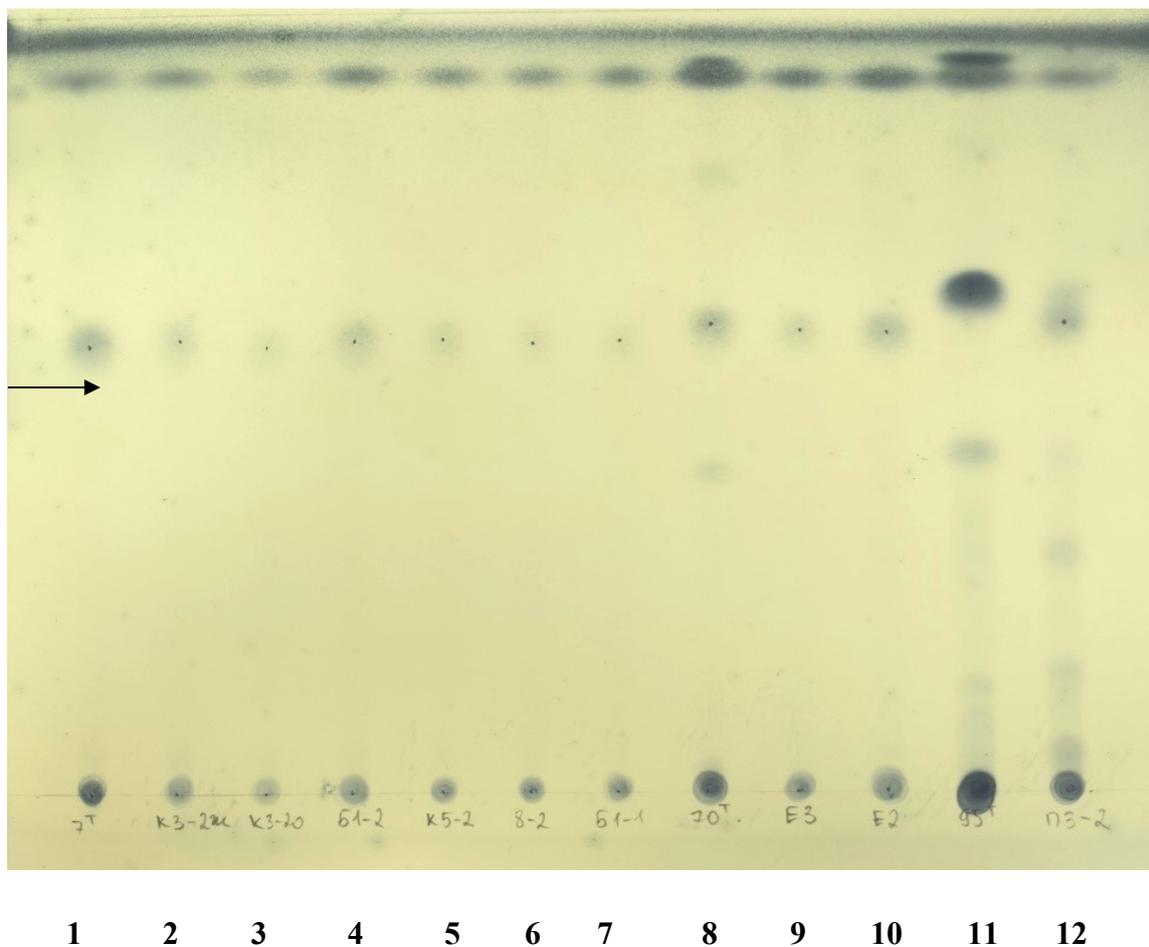


Рис. 19П. Тонкослойная хроматограмма метанолизатов целых бактериальных клеток: 1 – *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 7^T; 8 – *R. ruber* ИЭГМ 70^T; 11 – *Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 95^T; 2–7, 9, 10, 12 – свежевыделенные изоляты. Стрелкой обозначен липид LCN-A. Занятие 9

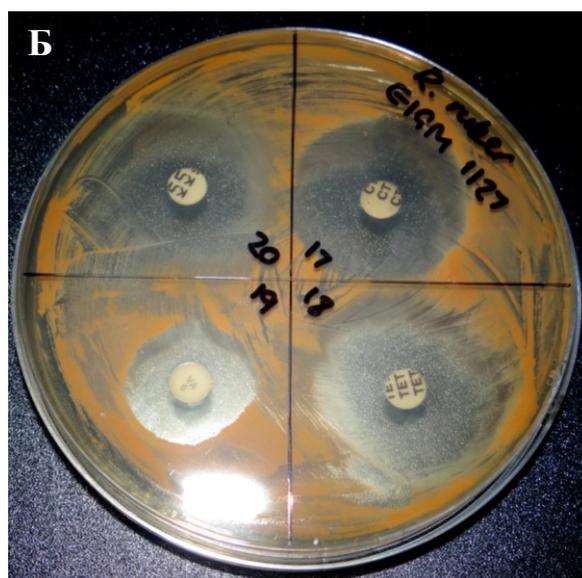
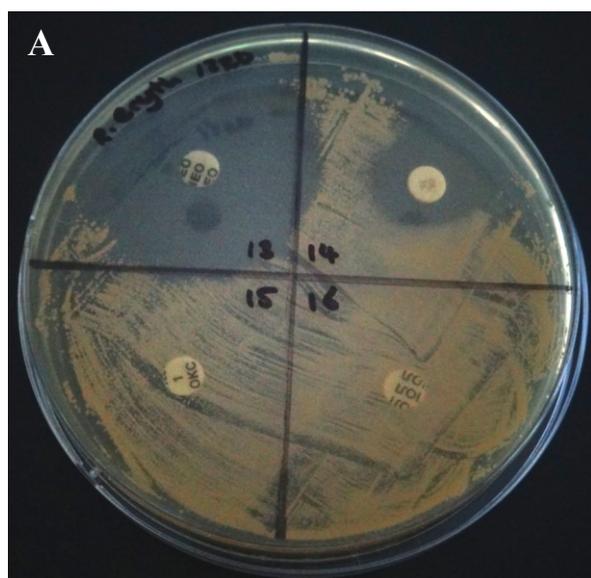


Рис. 20П. Определение чувствительности бактерий к антибиотическим веществам. Диско-диффузионный метод. Занятие 10



Рис. 21П. Способы хранения бактерий: А – в лиофилизованном состоянии; Б – на дисках фильтровальной бумаги; В – в виде замороженных суспензий при температуре $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$; Г – низкотемпературный ($-85\text{ }^{\circ}\text{C}$) вертикальный морозильник (Sanyo, Япония); Д – холодильные камеры ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$); Е – путем субстратного культивирования (периодические пересевы. Занятие 11

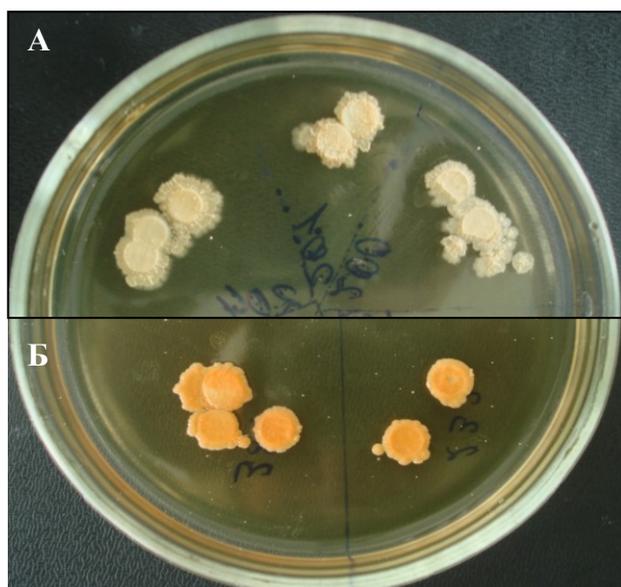


Рис. 22П. Восстановление на мясопептонном агаре культур, иммобилизованных на бумажных дисках: А – штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 203, ИЭГМ 682, ИЭГМ 691; Б – *R. ruber* ИЭГМ 335, ИЭГМ 336. Срок хранения дисков – 14 мес. Занятие 11



Рис. 23П. Лиофильная установка для вакуумной сушки Alpha 1-2 LD (CHRIST, Германия). Занятие 11



Рис. 24П. Колонии микроорганизмов на мясопептонном агаре, полученные при определении загрязнения воздуха. Занятие 12

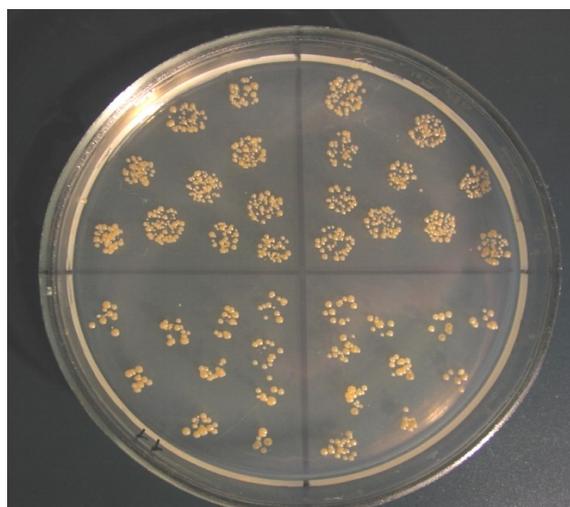


Рис. 25П. Колонии коллекционных культур *Rhodococcus*, полученные методом точечных высевов. Занятие 14

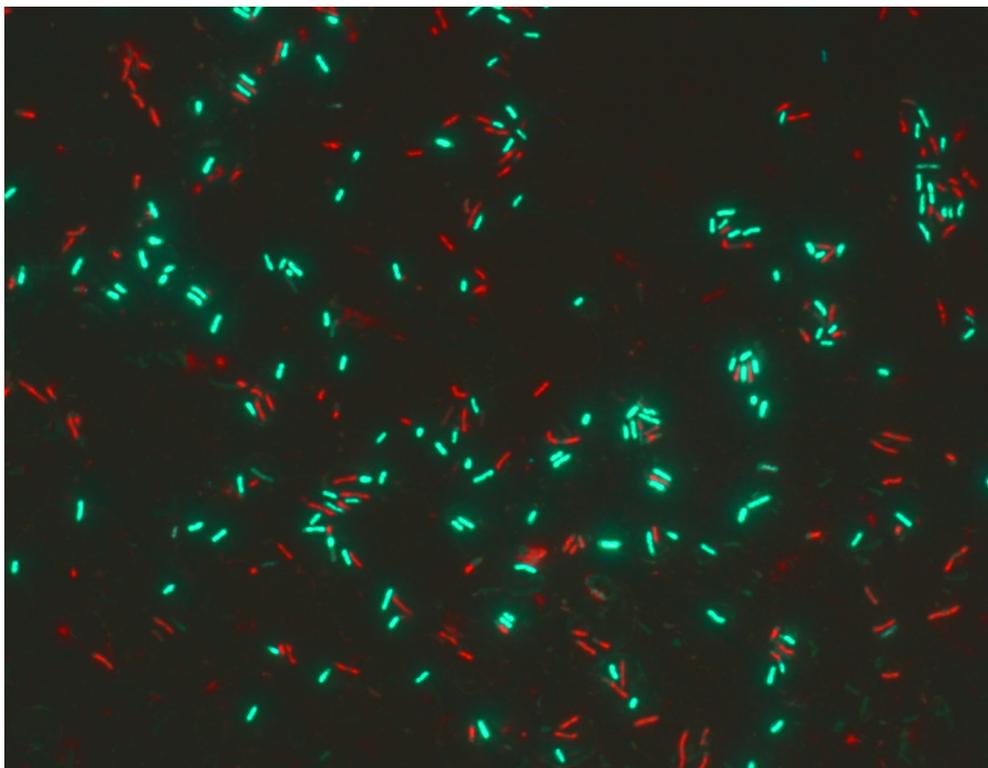


Рис. 26П. Живые (зелёные) и мёртвые (красные) клетки *Rhodococcus rhodochrous* 62^T, окрашенные двухкомпонентным красителем Live-Dead (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit). Люминесцентная микроскопия. Занятие 15

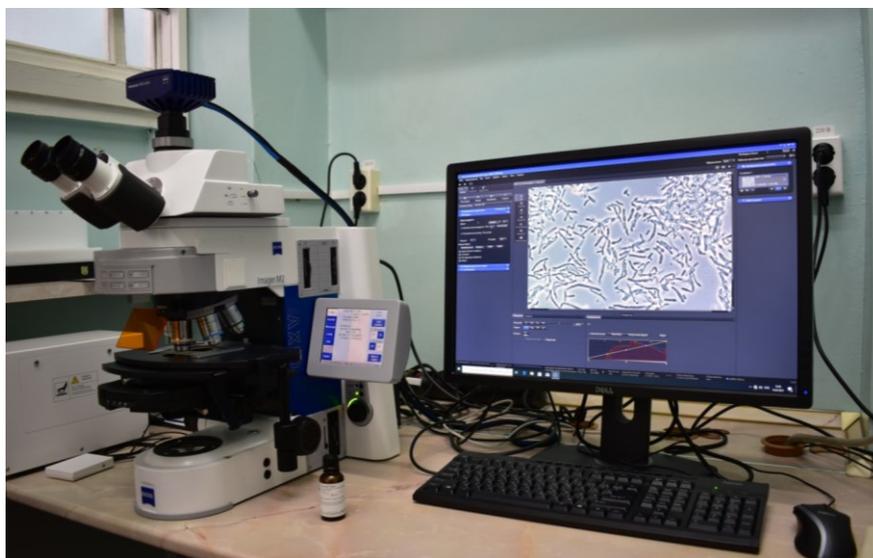
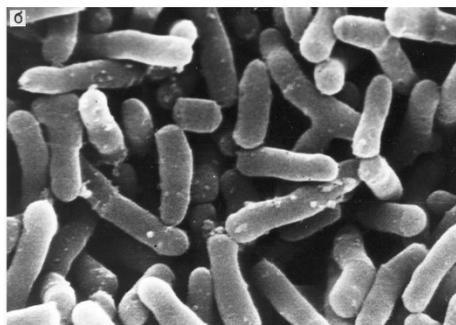


Рис. 27П. Автоматизированная визуализирующая система – микроскоп прямой исследовательский Axio Imager 2 (Zeiss, Германия) с возможностью флуоресценции. Занятие 15

Способ получения культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов

Предоставление культур, перечисленных в данном издании (см. Приложение 3), осуществляется на основании официального запроса организации/заказчиков. Наименование вида и номер запрашиваемого коллекционного штамма следует указывать в соответствии с электронным каталогом (<http://www.iegmcoll.ru>). Заказы на культуры должны быть направлены по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН. Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов. Телефон: +7(342) 280 81 14. Факс: +7(342)280 92 11. Электронная почта: info@iegmcoll.ru.



Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, <http://www.iegmcoll.ru>)

Действующая в Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН коллекция ориентирована на интересы биотехнологии и специализируется на поддержании непатогенных актинобактерий, ведущих окисление природных и антропогенных углеводов. Аналоги такой коллекции отсутствуют. При разработке концепции профиля коллекции учитывался тот факт, что Пермский край – один из перспективных нефтегазопромысловых районов европейской части Российской Федерации, что сопряжено с экологическими проблемами, в том числе нефтяными загрязнениями.

Коллекция ИЭГМ признана Уникальной научной установкой, имеет статус Центра коллективного пользования (ЦКП 480868) и входит в Национальный реестр объектов научной инфраструктуры РФ (<https://ckp-rf.ru/usu/73559/>). Является членом Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC, <https://wfcc.info>) и Европейской ассоциации коллекций культур (European Culture Collections' Organization, ECCO, <https://www.eccosite.org/>); включена во Всемирный справочник коллекций культур (World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms, WCDM, www.wdcm.org); входит в сеть специализированных российских коллекций немедицинского профиля; имеет компьютеризированную базу данных, функционирующую в операционной системе «Oracle Standard Edition» (версия 9i) и оборудованную диалоговой поисковой системой; располагает современными методами полифазной таксономии. Квалифицированный персонал коллекции обладает навыками работы с углеводородокисляющими микроорганизмами, таксономическим опытом и практикой профессионального хранения биотехнологически ценных живых культур. Представление о коллекции дает электронный каталог штаммов, размещенный в Internet и во Всемирной федерации коллекций культур микроорганизмов (WFCC–MIRCEN World Federation for Culture Collections www.wfcc.info). Сведения о поддерживаемых коллекционных культурах включены в Сводный каталог российских коллекций (Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections, <http://www.vkm.ru>) и Глобальный каталог микроорганизмов (WFCC Global Catalogue of Microorganisms, GCM, <http://gcm.wdcm.org/>).

Объем генофонда составляет 3000 чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур, выделенных в результате многолетних экспедиций и полевых исследований из многих тысяч образцов почв, поверхностных и пластовых вод, снега, воздуха, керна, отобранных из контрастных эколого-географических регионов.

Ценность коллекции в том, что многие виды бактерий представлены в ней не единичными штаммами, а многочисленными природными изолятами из различных мест ареала с охватом основных климатических регионов РФ. Это позволяет целенаправленно проводить отбор активных продуцентов ценных веществ и биодеструкторов органических загрязнителей. Среди коллекционных культур, наряду с типовыми штаммами валидных видов актинобактерий, широко представлены экстремотолерантные штаммы, имеющие значительный потенциал для промышленной эксплуатации; психроактивные штаммы с широким температурным диапазоном; штаммы-биопродуценты аминокислот, ферментов, липидов с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, биосурфактантов (поверхностно-активных веществ биогенного происхождения); штаммы-биодеструкторы различных поллютантов, в том числе сырой нефти и нефтепродуктов.

Коллекция располагает типовыми и референтными штаммами, принадлежащими к родам *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Curto-bacterium*, *Dermatococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*, *Williamsia* (всего 86 видов актинобактерий). В коллекции собран наиболее полный в стране и за рубежом фонд непатогенных штаммов родококков с высокой активностью оксигеназного ферментного комплекса. Собранный фонд культур родококков – удобный объект для изыскания новых продуцентов ценных веществ, деструкторов и трансформаторов ксенобиотиков и активных биоаккумуляторов ионов тяжелых металлов, а также для конструирования новых форм и создания новых биологических технологий.

На основе ресурсного потенциала коллекции разработан (Патент РФ 2180276) эффективный биопрепарат нового состава и новой (олеофильной) формы, пригодный для очистки нефтезагрязненных почв в регионах с холодным климатом. В результате междисциплинарной кооперации с коллегами из ОАО «ПермНИПИнефть» (Пермь, Россия), Университета Нэйпира (Эдинбург, Великобритания) и Исследовательского центра оценки и ремедиации загрязненных земель (CLARCC) Эдинбургского университета (Эдинбург, Великобритания) разработаны оригинальный метод получения биосурфактантов и экологически безопасная экспрестехнология биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов (Патент РФ 2193464), прошедшая испытания на территории Пермского края. Данная биотехнология предусматривает использование бактериальных сурфактантов и гарантирует получение экологического эффекта в течение одного вегетационного периода (в том числе в регионах с холодным климатом) и возможность широкого применения на нефтедобывающих и нефтеперерабатывающих предприятиях. На базе коллекции совместно с коллегами из Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (Москва, Россия) разработан способ получения носителя иммобилизованных микроорганизмов (Патент РФ 2298033), на основе которого получены лабораторные образцы устойчивых биокатализаторов многофункционального назначения, по основным технологическим параметрам отвечающие требованиям рынка и промышленной биотехнологии (Патенты РФ 2472857, 2477316, 2496866, 2529365, 2607027, 2707536, 2762007). Созданные биокатализаторы могут применяться для получения практически ценных продуктов биосинтеза на углеводородном сырье, биоремедиации загрязненных нефтью и нефтепродуктами экосистем, в производстве биологически активных интермедиатов для фармацевтической промышленности.

В настоящее время реально использование ресурсного потенциала коллекции в различных областях биотехнологии – от биологической индикации углеводородных залежей до интенсификации процессов биодеградациии нефтяных загрязнений и биокатализа в тонком синтезе.

Программа последовательных действий развивающегося на Урале биологического ресурсного центра, помимо аспектов фундаментальных исследований (комплексное изучение биологии алканотрофов, адаптационных механизмов их выживания в антропогенно нарушенных экосистемах) и собственно коллекционной работы (адекватный сбор природного материала, классификация и таксономическое описание выделенных культур; оценка их биотехнологической пригодности; разработка методов долгосрочного хранения культур и их функционального разнообразия; совершенствование информационного сопровождения культур в

соответствии с международными стандартами; обеспечение непрерывности передачи потребителям штаммов и накопленной научной информации о них), включает прикладные исследования с использованием коллекционного генофонда алканотрофов и способствует их практическому внедрению в различных областях биотехнологии (получение новых препаратов, разработка и совершенствование перспективных технологий).

Коллекция ИЭГМ – это не только научно-исследовательский, но и научно-образовательный центр. На базе коллекции проходят подготовку студенты и аспиранты различных учебных заведений, выполняющие курсовые, дипломные работы, магистерские и кандидатские диссертации. Работают краткосрочные обучающие курсы по выделению, культивированию и идентификации алканотрофных микроорганизмов. Коллекция оказывает сервисные услуги исследовательским, промышленным и учебным организациям: предоставляет аутентичные культуры актинобактерий и информацию о свойствах штаммов и потенциальных сферах их применения; проводит скрининговые работы по обнаружению микроорганизмов с заданными свойствами; консультирует по вопросам выделения, таксономии, биологических особенностей и консервации алканотрофов; выполняет паспортизацию микроорганизмов и другие виды договорных работ.

Приложение 3

Наборы коллекционных бактериальных культур для занятий

Штамм	Исходный материал	Занятие
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, ИЭГМ 72, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 320, ИЭГМ 333, ИЭГМ 628, <i>R. jostii</i> ИЭГМ 60, <i>R. aetherivorans</i> ИЭГМ 1250, <i>R. wratislaviensis</i> ИЭГМ 1171	Чистые культуры, выращенные на мясопептонном агаре, агаризованной минерально-солевой среде «К» в присутствии <i>n</i> -гексадекана, а также в атмосфере пропана	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ИЭГМ 2841, <i>P. putida</i> ИЭГМ 2662, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 716, <i>R. opacus</i> ИЭГМ 56, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 ^T , ИЭГМ 319, ИЭГМ 333, ИЭГМ 381	Чистые культуры, выращенные на скошенном МПА	5
<i>Dietzia maris</i> ИЭГМ 1175, <i>Gordonia amicalis</i> ИЭГМ 1277, <i>Micrococcus luteus</i> ИЭГМ 1206, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 ^T , ИЭГМ 270, <i>R. ruber</i> ИЭГМ ИЭГМ 71	Фиксированные препараты и витальные чистые культуры, выращенные на скошенном МПА	6
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 ^T , ИЭГМ 96, ИЭГМ 105, ИЭГМ 128, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 1244, ИЭГМ 1245, ИЭГМ 1246, ИЭГМ 1247, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 333, ИЭГМ 592, ИЭГМ 593, ИЭГМ 594, ИЭГМ 595, ИЭГМ 596, ИЭГМ 597, ИЭГМ 598, <i>Rhodococcus</i> sp. ИЭГМ 1283, ИЭГМ 1284, ИЭГМ 1285, ИЭГМ 1286	Чистые культуры, выращенные на скошенном МПА	7
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 ^T , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 ^T , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 ^T , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 ^T , <i>Rhodococcus</i> sp. ИЭГМ 1324, ИЭГМ 1325, ИЭГМ 1326, ИЭГМ 1327, ИЭГМ 1328, ИЭГМ 1329	Чистые культуры, выращенные на скошенном МПА	8

Приложение

Штамм	Исходный материал	Занятие
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ИЭГМ 1861, <i>Gordonia rubropertincta</i> ИЭГМ 95 ^T , <i>Microbacterium imperiale</i> ИЭГМ 827, <i>Nocardia farcinica</i> ИЭГМ 621, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 ^T , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 ^T	Метанолизаты целых бактериальных клеток	9
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. fascians</i> ИЭГМ 43, <i>R. globerulus</i> ИЭГМ 591 ^T , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 555 ^T , <i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 1016 ^T , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 716 ^T , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, <i>R. yunnanensis</i> ИЭГМ 1071 ^T , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 ^T	Спектры антибиотикочувствительности актинобактериальных культур	10
<i>Dietzia maris</i> ИЭГМ 45, ИЭГМ 55 ^T , ИЭГМ 166, ИЭГМ 291, <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 ^T , ИЭГМ 96, ИЭГМ 105, ИЭГМ 128, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 203, ИЭГМ 209, ИЭГМ 682, ИЭГМ 691, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 333, ИЭГМ 334, ИЭГМ 335, ИЭГМ 336, ИЭГМ 337, ИЭГМ 1219, <i>Rhodococcus</i> sp. ИЭГМ 1376, ИЭГМ 1377	Чистые культуры, выращенные на косяках с МПА, а также минерально-солевой средой «К» с <i>n</i> -алканами (C ₃ , C ₁₆)	11
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 730, ИЭГМ 732, ИЭГМ 734, ИЭГМ 735, <i>D. maris</i> ИЭГМ 316, ИЭГМ 464, ИЭГМ 516, ИЭГМ 1172, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 203, ИЭГМ 209, ИЭГМ 682, ИЭГМ 691, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 333	Чистые культуры, выращенные на скошенном МПА	13
<i>R. coprophilus</i> ИЭГМ 600 ^T , <i>R. Erythropolis</i> ИЭГМ 7 ^T , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 60, ИЭГМ 61, ИЭГМ 716 ^T , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 ^T , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 ^T , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 ^T , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 ^T	Криопробирки с замороженными актинобактериальными культурами	14
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 862 ^T , <i>Corynebacterium</i> sp. ИЭГМ 866, <i>D. maris</i> ИЭГМ 55 ^T , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95, <i>M. chlorophenolicum</i> ИЭГМ 559 ^T , <i>Mycobacterium</i> sp. ИЭГМ 828, <i>Pseudomonas</i> sp. ИЭГМ 2036, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 ^T , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 56, <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 ^T , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 ^T	Ампулы с лиофилизированными актинобактериальными культурами	15

Примечание. ИЭГМ – официальный акроним Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegmccl.ru>). ^T – Типовой штамм.

Правила работы с пипетками (дозаторами) переменного объема

При работе с пипетками необходимо производить отбор образца под правильным углом; требуется предварительная промывка наконечников, правильное заполнение и соответствующая глубина погружения.

Следует помнить:

1. Угол погружения пипетки должен быть максимально приближен к 90° и не должен отклоняться более чем на 20° от вертикали. Если угол будет больше, уровень жидкости будет ниже, чем при калибровке пипетки. Это может привести к тому, что в наконечник попадет слишком много жидкости, а это повлияет на точность.

2. Дозируйте образцы с одинаковым стабильным темпом. Не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

3. При работе с большими объемами (от 1 мл), делайте паузу около 1 сек или больше после отбора образца, не вынимая наконечник из жидкости. Это позволит полностью вобрать образец. Вынимайте наконечник только после завершения отбора образца.

4. Нажимайте и отпускайте поршень плавно, сохраняя одну скорость. Неконтролируемый забор жидкости может привести к образованию пузырьков, брызг и загрязнению ствола и поршня пипетки.

5. Дозируемая жидкость оставляет на наконечнике тонкий слой, поэтому получаемый объем всегда оказывается чуть меньше положенного. При использовании нового наконечника его следует предварительно промывать не менее двух раз в той жидкости, которая будет дозироваться, чтобы компенсировать эту пленку. *Следует помнить:* предварительная промывка может отрицательно сказаться на результатах при дозировании очень теплых или холодных растворов, так как это может привести к погрешности.

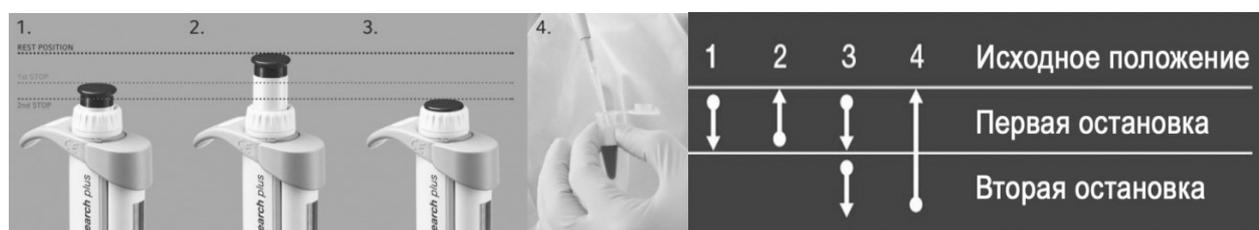
6. Можно добиться высочайшей точности и воспроизводимости результатов от образца к образцу, если жидкость будет полностью выходить из пипетки, не оставаясь на наконечнике. В большинстве случаев при дозировании необходимо, чтобы кончик наконечника опирался на стенку сосуда, так как это уменьшает или полностью устраняет удержание образца. Вынимайте пипетку, скользя наконечником вдоль боковой стенки, чтобы удалить последние капли с отверстия наконечника.

7. Рекомендуемый диапазон дозирования составляет от 35 до 100% номинального объема.

8. Наконечник следует погружать в образец на глубину 1–2 мм для пипеток, предназначенных для микрообъемов, и на 6–10 мм для пипеток, рассчитанных на большие объемы. Если погрузить наконечник слишком глубоко, то это может привести к всасыванию излишнего количества жидкости. Жидкость, задержавшаяся на поверхности наконечника, также может повлиять на точность результатов. Если не погрузить наконечник на достаточную глубину, в него может попасть воздух.

Техника пипетирования (прямой метод)

Прямой метод пипетирования рекомендуется для водных растворов, разбавленной кислоты или щелочи. Метод обычно используется при внесении отобранного объема в другую жидкость с последующим смешиванием путем пипетирования. Для реализации данной техники следуйте рекомендациям (рисунок):



1. Нажать на поршень дозатора до первой остановки.
2. Погрузить наконечник в раствор и плавно отпустить поршень. Извлечь наконечник с жидкостью.
3. Выпустить взятую жидкость, плавно нажимая на кнопку поршня до первой остановки (упора). После короткой паузы дожать поршень до второго упора. При этом наконечник полностью опустошается. Не отпуская кнопки, вынуть наконечник из раствора.
4. Отпустить поршень, вернув его в исходное положение. При необходимости сменить наконечник и продолжать пипетирование.

Приложение 5

Средства для мытья лабораторной посуды

Хромовая смесь № 1. В концентрированную серную кислоту добавляют около 5% (от объема серной кислоты) размельченного в порошок кристаллического двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$) и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения.

Хромовая смесь № 2. Двуххромовокислый калий растворяют в воде, затем в раствор осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят из расчета: вода – 100 мл, двуххромовокислый калий – 6 г, серная кислота (плотность 1,84) – 100 мл.

После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая смесь не обладает моющими свойствами. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную углеводородами.

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

Спиртовый раствор КОН – эффективное моющее средство. Его готовят растворением 40–50 г КОН в 500 мл воды. После остывания к раствору добавляют спирт-сырец в таком количестве, чтобы общий объем составил 1000 мл.

Приложение 6

Средства для обработки рабочего стола

Водный раствор хлорамина. Для приготовления одного литра 3%-ного водного раствора хлорамина в одном литре водопроводной воды вносят 30 г хлорамина и перемешивают жидкость до полного растворения препарата.

Водный раствор лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла). Для приготовления одного литра 3%-ного раствора лизола смешивают 30 г лизола и 970 мл воды.

Приложение 7

Обработка предметных стекол

Стекла кипятят в течение 10 мин в растворе следующего состава: биохромат калия – 20 г, дистиллированная вода – 200 мл, концентрированная серная кислота – 20 мл. Затем промывают в течение 5 мин слабым раствором едкого натра, далее проточной водопроводной водой. Погружают в дистиллированную воду на 12 ч. Высушивают в вертикальном положении. С целью долгосрочного хранения стекла помещают в банку с притертой пробкой, содержащую смесь Никифорова (смесь (1:1) этилового эфира и этилового спирта). Перед работой стекла извлекают пинцетом и протирают чистой сухой полотняной салфеткой. На стеклах не должно

быть пятен от пальцев. Подготовленные стекла можно хранить неопределенно долгое время, сложив в пакеты по 10–20 штук и завернув в бумагу.

При отсутствии заранее приготовленных обезжиренных стекол их можно быстро подготовить, натирая в сухом виде хозяйственным мылом и затем очищая чистой хлопчатобумажной тканью.

Приложение 8

Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе

Лабораторная работа должна иметь вид законченного научного эксперимента и оформляться в виде исследовательского отчёта. Отчет по конкретной лабораторной работе должен содержать соответствующие разделы.

Титульный лист: ведомственная принадлежность, название работы, список исполнителей, место и дата проведения.

Оглавление: с перечнем ниже приведенных глав и разделов, указанием номеров страниц.

Введение: раскрывает основное содержание работы, суть используемых методов и их возможности, обоснование научной проблемы, на решение которой направлена данная работа.

Объект: указывается выбранный для эксперимента объект (объекты), схема отбора проб или схема постановки эксперимента.

Оборудование и реактивы: указывается список приборов и аналитического оборудования, перечень реактивов (с расчётом концентраций, ходом приготовления).

Общие требования безопасности при выполнении работы: указывается, с какими реагентами, какой лабораторной посудой и на каких этапах эксперимента следует проявлять особую осторожность и внимательность.

Ход работы: указывается способ подготовки проб к анализу (измерению), последовательность действий при выполнении анализа.

Вышеуказанные разделы готовятся студентами до начала лабораторной работы (т. е. входят в перечень заданий для самостоятельной работы, см. ниже) и сдаются преподавателю перед началом лабораторной работы.

Приведенные ниже разделы отчёта оформляются студентами после проведения лабораторной работы и сдаются преподавателю в печатном виде.

Результаты: в табличной форме приводятся экспериментальные данные с расчётом необходимых статистических показателей (диапазон измерений, точность, погрешности, характер распределения) в зависимости от типа эксперимента и использованного оборудования.

Обсуждение: проводится интерпретация экспериментальных данных, анализируются сведения из научной литературы, теоретические данные по проблеме исследования.

Заключение: обобщение полученных результатов.

Литература: приводится список литературы, использованной при выполнении лабораторной работы, в ходе обработки и интерпретации результатов.

Учебное издание

Ившина Ирина Борисовна
Каменских Татьяна Никодимовна
Тюмина Елена Александровна
Елькин Андрей Анатольевич

Микробиология

Рабочая тетрадь для лабораторно-практических занятий

Практикум

Редактор *Л. А. Богданова*
Корректор *Л. И. Семицветова*
Компьютерная вёрстка: *Л. С. Нечаева*

Подписано в печать 10.08.2022. Формат 60×84/8
Усл. печ. л. 11,63. Тираж 300 экз. Заказ 132

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Типография
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15