

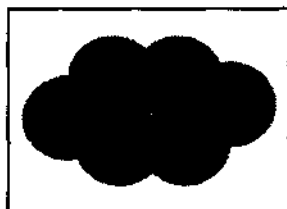
1
МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра биологической химии

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ**

Часть 3



**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННОГО
ШТАММА**

для студентов биологического факультета дневного отделения

Издательство "Самарский университет" -
1997

Данный практикум отражает круг вопросов, предусмотренных программой изучения дисциплины "Микробиология и вирусология" на биологическом факультете университета. Доступное изложение теоретического материала и детальные пояснения к выполнению лабораторных занятий позволяет студентам ознакомиться с морфологическими, физиологическими и биохимическими свойствами микроорганизмов, освоить необходимые приемы и методы выявления внутриклеточных структур, определение сахаролитической активности и антибактериальной чувствительности выделенных микроорганизмов.

Пособие предназначено для студентов биологических факультетов университетов и биологов, желающих освоить микробиологические приемы и методы исследования.

Составитель ст. преподаватель Н.А.Трещанина

Ответственный редактор канд. биол. наук, доц. Ю. П. Фролов.

Рецензент доктор биол. наук, профессор М. М. Серых

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящий практикум включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен описанию приемов работы с чистыми культурами микроорганизмов, технике микроскопирования препаратов, принципам составления питательных сред и способам стерилизации. Второй раздел посвящен описанию различных методов получения чистых культур микроорганизмов и более детальное описание метода Коха. В разделе дается подробное описание метода идентификации прокариот по методу Грама.

Третий раздел посвящен описанию методов изучения некоторых морфологических, физиологических и биохимических признаков прокариот, которые позволят студентам освоить приемы прижизненной окраски клеток, выявления запасных питательных веществ и эндоспор, освоить приемы глубокого посева бактерий и научиться выявлять биохимические свойства микроорганизмов. Полученные сведения позволят студентам дополнительно изучить, идентифицировать выделенные штаммы и написать научный отчет по проделанной работе.

Описанию практических работ предшествует кратко сформулированная цель занятия, теоретическое вступление, необходимое для понимания студентами сущности изучаемых вопросов, перечислено оборудование, реактивы и материалы, необходимые для выполнения этих работ. Замечания по технике безопасности даются по ходу изложения конкретных работ.

Настоящий практикум предназначен в качестве дополнения к стандартным учебникам и студенческим конспектам лекций, используемым при изучении данного предмета. Он составлен в соответствии с программой курса "Микробиология и вирусология" для студентов университетов специальности "Биология" и отражает методику преподавания данной дисциплины в Самарском государственном университете.

Занятие № 11

ПОСЕВ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с некоторыми дифференциально-диагностическими средами, которые используют при изучении биохимических свойств прокариот. Освоить технику глубинного посева микроорганизмов методом укола.

ПРИМЕНЕНИЕ И СОСТАВ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО- ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕД

Как указывалось ранее, дифференциально-диагностические среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида.

Дифференциально-диагностические среды широко применяются в клинической бактериологии, например, чтобы отделить патогенные кишечные бактерий от других постоянных обитателей кишечника, разлагающих лактозу. В этом случае используют несколько групп сред. Среда первой группы – *дифференциальные* – содержат лишь лактозу и индикатор, на них растут как грамположительные, так и грамотрицательные лактозоположительные микроорганизмы. Среда второй группы – *элективные* – содержат дополнительные вещества, которые задерживают рост грамположительных бактерий. Среди них широко применяются среды Эндо (для сальмонелл и патогенных сероваров кишечной палочки) и Левина (для всех энтеробактерий). Среда третьей группы – *селективные* – кроме веществ, подавляющих рост кишечной палочки и других сопутствующих микроорганизмов, содержат вещества, стимулирующие рост определенных патогенных энтеробактерий. Например, селективной средой для сальмонелл является висмут-сульфитная среда, а для дизентерийных и тифозных бактерий – среда Плоскирева.

Индикаторные среды применяются также при генетических исследованиях и при идентификации микроорганизмов.

К дифференциально-диагностическим средам относятся и среды Гисса, мясо-пептонная желатина (МПЖО, полусинтетические среды с крахмалом и целый ряд других сред, широко применяющихся в практике).

Цветные среды Гисса являются средами для определения сахаролитических ферментов используются для выяснения возможности развития бактерий за счет тех или иных углеродсодержащих веществ. Используют среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и

полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. В зависимости от количества используемых в работе различных источников углерода, эти среды называют малым или большим пестрым рядом Гисса.

Основной фон среды готовят на водопроводной воде; он включает 0,5% пептона и 0,1% K_2HPO_4 . Углеводы или спирты добавляют к основному фону среды в количестве 1%. Применяют, как правило, следующие углеводы: арабинозу, ксилозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, рамнозу и спирты - глицерин, сорбит, маннит и др. Чтобы обнаружить изменение pH, к среде добавляют индикатор - бромкрезолпурпур, который при pH 6,8 имеет пурпурный, а при pH 5,2 - желтый цвет. Вместо бромкрезолпурпурного можно использовать бромтимолблау, который при pH 6,0 имеет желтый, а при pH 7,6 - синий.

Чтобы обнаружить образование газа в пробирке с твердыми средами используют посев уколом, в жидкую среду опускают поплавки (запаянные с одного конца специальные трубочки) запаянным концом вверх.

Основную среду стерилизуют при 1 атм., углеводы и спирты - в виде 10%-ных растворов при 0,5 атм. и добавляют к стерильному фону среды. Растворы дисахаридов лучше стерилизовать фильтрованием, чтобы избежать их гидролиза при высокой температуре.

Все среды с углеводами и спиртами засевают одновременно клетками изучаемого микроорганизма методом укола и ставят в термостат. Если изучаемый организм развивается быстро, то результаты можно регистрировать через 48-96 час, а если медленно - через 7-10 суток.

Мясо-пептонная желатина (МПЖ) является средой для определения протеолитических ферментов и используется *для выявления способности исследуемых микроорганизмов выделять в среду протеолитические ферменты (протеазы).*

Среда содержит мясо-пептонный или рыбо-пептонный бульон к которой добавляют желатину в концентрации 10-15%. Стерилизацию осуществляют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 15 мин, либо проводят дробную стерилизацию в аппарате Коха. Посев проводят уколом и культивируют 7-10 суток *при комнатной температуре.*

Среда с крахмалом является средой для определения амилолитических ферментов и используется *для выявления способности исследуемых микроорганизмов выделять в среду амилолитические ферменты (амилазы).*

Среда содержит пептон, KH_2PO_4 , растворимый крахмал и агар-агар. Среду стерилизуют при 1 атм. и разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру высевают штрихом по диаметру чашки и культивируют от 2 до 10 суток в термостате.

ОБОРУДОВАНИЕ: спиртовка, штатив, бактериологическая петля, стерильные пробирки (со средами), стерильная чашка Петри (со средой).

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, среды Гисса с глю-

козой, сахарозой, мальтозой, лактозой и маннитом, МПЖ., среда с крахмалом, коробок спичек.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выделенные чистые культуры бактерий.

ЗАДАНИЕ:

1. Проанализировать визуально чистую культуру микроорганизмов: проверить рост культуры по штриху и сопоставить с описанным ранее (см. занятие N 10).
2. В тетради оформить и заполнить таблицу 1 (см. ниже) о составе, первоначальном цвете и консистенции используемых сред, условиях стерилизации, методах посева бактерий на данные среды.
3. Пересеять часть клеток штамма в пробирки со стерильными средами Гисса и МПЖ (метод укола) и в чашки Петри с крахмальной средой (метод штриха).
4. Подписать пробирки и чашки, пробирки со средами Гисса и чашки поместить в термостат, пробирки с РПЖ оставить при комнатной температуре. В тетради отметить условия культивирования (температура и продолжительность выращивания).
5. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
6. Пробирки с чистыми культурами оставить при комнатной температуре до выращивания штамма на дифференциальных средах.
7. Чашки с клонами передать лаборанту для уничтожения микрофлоры.
8. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При анализе роста культуры по штриху воспользуйтесь признаками, описанными в занятии N 8 и отметьте результаты в тетради.

2. До засева используемых сред клетками бактерий, опишите первоначальное состояние данных сред в виде табл. 1

Таблица 1

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СРЕД

СРЕДА	СОСТАВ	УСЛОВИЯ СТЕРИЛ.	ЦВЕТ, КОНСИСТ.	СПОСОБ ПОСЕВА
✓			✓	✓

При пересеве бактерий из пробирки в пробирку необходимо соблюдать все меры предосторожности для сохранения чистоты культуры и безопасной работы:

1. в левую руку удобно возьмите две пробирки – одну со стерильной средой (ближе к себе), другую – с культурой микроорганизмов (дальше от себя).

В правую руку возьмите бактериологическую петлю и тщательно прокалите.

2. Откройте одновременно две пробирки, прижав пробки к ладони мизинцем и безымянным пальцами правой руки и обожгите края пробирок в пламени.

3. Остудив петлю о внутреннюю поверхность пробирки, снимите часть клеток штамма со среды и, не касаясь стенок и краев пробирки, вынимайте петлю.

ВНИМАНИЕ ! *При взятии материала пробирки необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.*

4. введите петлю с клетками в центральную часть столбика среды до дна пробирки - посев укол ом .

5. осторожно, не разрыхляя столбик среды, достаньте петлю из пробирки и *тщательно сожгите на ней остатки материала* (см занятие N 3).

6. аналогичным образом засейте остальные пробирки со средами.

7. снимите часть клеток штамма, как указывалось выше, и в стерильных условиях, приоткрыв крышку чашки, перенесите их на поверхность среды с крахмалом. Проведите несколько штрихов по диаметру чашки и быстро закройте крышкой.

8. *тщательно сожгите на петле остатки среды и бактериологического материала.*

ВНИМАНИЕ ! Богатые углеводные среды легко засеваются микрофлорой воздуха и используются многими микроорганизмами. Поэтому от исследователя требуется тщательное соблюдение правил работы, которые позволят предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Всю работу необходимо проводить в стерильной зоне пламени, как указано в занятии N 3.

ВНИМАНИЕ (Техника безопасности . Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около проводящего посев микроорганизмов, так как движение воздуха увеличивает случайность загрязнения культуры.

Вопросы для самопроверки

1. Какие приемы техники безопасности обязан соблюдать микробиолог при работе с микроорганизмами? Что может произойти в случае их невыполнения?

2. Какие меры предосторожности необходимо соблюдать при работе с чистыми культурами микроорганизмов? Как это может повлиять на получение объективных данных исследования?

3. Какие способы посева микроорганизмов на твердые среды вам известны? Чем они различаются между собой и в каких случаях применяют тот или иной прием?

4. Чем дифференциальные среды отличаются от элективных?

5. В каких случаях используют элективные среды, а в каких селективные?

6. Какой принцип лежит в основе приготовления дифференциально-диагностических сред для прокариот? Какие компоненты входят только в их состав и почему?

7. К каким средам (жидкие, твердые, гелеобразные, натуральные, полусинтетические, синтетические) относятся дифференциально-диагностические среды?

8. Можно ли на таких средах выделить клоны микроорганизмов? Ответ обоснуйте.

9. Как с помощью дифференциально-диагностических сред можно проверить чистоту выделенной культуры микроорганизмов? Ответ поясните.

10. Почему на дифференциальных средах протеазы микроорганизмов выявляют при комнатной температуре, а другие ферментативные активности в термостате?

11. Какие ещё дифференциально-диагностические среды, кроме указанных выше, вам известны? Где и для каких целей их применяют?

Занятие № 12

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться и освоить метод выявления особенностей метаболизма прокариот с помощью дифференциально-диагностических сред. Определить степень аэробности или анаэробности выделенного штамма с помощью данных сред.

ПРИЗНАКИ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ОПИСАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

При изучении любого процесса, связанного с жизнедеятельностью микроорганизмов, необходимо знать их таксономическое положение, которое можно выяснить только после идентификации данных организмов. Для этих целей подробно изучаются различные признаки: морфологические, культуральные, физиолого-биохимические, проводят серологические тесты или определяют фагочувствительность.

Принадлежность организма к классу, порядку, семейству, а иногда даже к роду можно установить на основании морфологических признаков и тех

сведений, которые исследователь получает в процессе выделения чистой культуры. Например выяснить, относится ли выделенный организм к хемолитоавтотрофам, хемоорганогетеротрофам или обладает способностью к фотосинтезу. Установление принадлежности прокариот к роду основано на изучении физиолого-биохимических признаков. Например, для определения принадлежности представителей к родам *Streptococcus* или *Leuconostoc* необходимо знать состав продуктов сбраживания гексоз, а для разграничения представителей семейства *Bacillaceae* определяющими признаками являются такие, как отношение к кислороду, образование каталазы и способность восстанавливать сульфаты до сульфидов. Для видовой идентификации большое значение стали придавать составу клеточной стенки и пигментов, содержанию отдельных нуклеотидов в ДНК, гибридизации молекул ДНК и рибосомальной РНК.

Ниже приводятся некоторые признаки, которые в настоящее время широко используются для идентификации бактерий.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Как указывалось ранее, некоторые особенности обмена веществ микроорганизмов выявляются с помощью принятых дифференциально-диагностических сред. По способности расти на этих средах и вызывать те или иные превращения веществ, входящих в их состав, судят об особенностях метаболизма и наличие конкретных ферментов в клетках.

Ниже приведены те признаки, которые, как правило, необходимы при определении таксономического положения различных бактерий.

Использование углеводов и сахаро-спиртов. Микроорганизмы характеризуются не одинаковой способностью использовать различные углеводы и спирты в качестве единственных источников углерода и энергии. Для идентификации большинства гетеротрофных организмов необходимо определить, какие углеводы и спирты обеспечивают их рост и какие при этом образуются конечные продукты обмена.

В качестве исходных субстратов используют арабинозу, ксилозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, **глицерин, маннит** и др. Рост на средах с этими соединениями может приводить к **накоплению** органических кислот, нейтральных продуктов и газов.

Накопление в среде органических кислот вызывает **ее подкисление**, поэтому образование кислот глечистрируют по изменению **цвета среды**. Известно, что индикатор - бромкрезолпурпур, входящий в **состав среды, при pH 6,8** имеет пурпурный, а при pH 5,2 - желтый цвет, а индикатор - бромтимолблау, при pH 6,0 - желтый цвет, а при pH 7,6 - синий. **Это дает возможность** быстро определить, какие из исследованных углеводов **используются** с образованием кислот.

При выделении газообразных продуктов **в процессе** метаболизма, на поверхности жидких сред может появиться пена **или** происходит вытеснение

среды из поплавка. В агаризованных средах появляются газовые пузырьки, а при интенсивном газообразовании наблюдаются разрывы столбика питательной среды.

Разжижение желатины. Разжижать желатину способны лишь те микроорганизмы, которые секретируют в окружающую среду протеолитические ферменты, которые катализируют расщепление белков на олигопептиды разной степени сложности. Продукты гидролиза затем поступают в клетку и используются в различных метаболических процессах. Внеклеточные протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетами, мицелиальными грибами и др. микроорганизмами.

Разжижение желатины или его отсутствие отмечают визуально. Если желатина среды разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения: послойное, воронкообразное, мешковидное, пузырчатое.

Гидролиз крахмала. Микроорганизмы, которые образуют внеклеточные амилазы, используют продукты гидролиза крахмала в качестве источника углерода и энергии. Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению, продукты гидролиза поступают в клетку и подвергаются утилизации. Активными продуцентами амилаз являются различные виды бацилл, псевдомонады, стрептомицеты, мицелиальные грибы и др. микроорганизмы.

Гидролиз крахмала обнаруживают по зоне просветления среды вдоль штриха или вокруг колонии микроорганизмов. Особенно четко она видна после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Так как йод является индикатором на крахмал, то вся среда в этом случае окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза крахмала остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если субстрат гидролизует до декстринов. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилолитическая активность культуры.

Отношение к кислороду. Как указывалось ранее, потребности микроорганизмов в свободном кислороде можно выяснить в процессе их выращивания различными способами. В частности, это можно выяснить и по характеру роста культуры по всему уколу в пробирке с агаровой или желатиновой средой. Следует помнить при этом, что посев должен осуществляться осторожно, точно по центру столбика среды и без разрыхления основной её массы. В этом случае, облигатные аэробы, растущие на воздухе, развиваются только на поверхности гряды, микроаэрофилы - в верхней части укола (рост в виде "гвоздя"), факультативные анаэробы развиваются равномерно по всему уколу, аэротолерантные формы - в нижней его части, а строгие анаэробы - на самом дне высокого столбика питательной среды.

ОБОРУДОВАНИЕ: кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, колба для воды, штатив, пипетка, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, раствор Люголя, раствор водного фуксина, вода для Приготовления и промывания препарата,

коробок спичек, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: штаммы бактерий, выращенные на средах Гисса, РПЖ и крахмальной среде.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать визуально характер роста исследуемого штамма на дифференциально-диагностических средах, как указано выше.
 2. Подробно описать изменения сред, в которых наблюдается рост бактерий. Все наблюдения внести в таблицу 2.
 3. Приготовить постоянные препараты бактерий из пробирок, в которых наблюдается рост культур (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин).
 4. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 5. На готовых препаратах сделать обозначения с каких сред они приготовлены, завернуть в бумаги и сдать лаборанту.
 6. Пробирки со средами Гисса оставить при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ до следующего занятия. В тетради отметить условия хранения чистой культуры.
 7. Пробирки с чистыми культурами и чашки с крахмальной средой передать лаборанту для уничтожения микрофлоры.
 8. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. Все наблюдения и полученные результаты оформите в виде табл. 2

Таблица 2

ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА ИССЛЕДУЕМОГО ШТАММА НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Показатели	Источник углерода						
	Контроль	Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Крахмал	Желатина
ЦВЕТ:							
до посева							
после роста							
КОНСИСТЕН.:							
до посева							
после роста							
ОБРАЗОВА-							
НИЕ ГАЗА							
ИНТЕНСИВН.							
И ХАРАКТЕР							
РОСТА							
МИКРОСКО-							
ПИРОВАНИЕ							
ВЫВОДЫ							

2. При визуальном анализе роста бактерий на средах Гисса отметьте рост или его отсутствие на всех использованных средах. Результаты сравните с контрольной средой, т.е. с фоном, не содержащим ни углеводов, ни спиртов.
3. Отметьте изменение цвета индикатора (см. занятие N 11) и среды, в ко-

торых видны газовые пузырьки. Особое внимание обратите на интенсивность и характер роста бактерий по всей длине прокола.

4. На среде с желатиной особо отметьте интенсивность роста и характер разжижения среды.

5. На крахмальной среде отметьте характер роста бактерий по штриху (см. занятие N 10), просветление среды вдоль штриха. После приготовления препарата на поверхность среды налейте 3 мл раствора Люголя. Замерьте зону гидролиза крахмала в мм от внешнего края штриха (или края колонии) до границы светлой зоны.

6. На основании полученных результатов сделайте заключение о том, какие углеводы и спирты использует изучаемый организм и чем сопровождается использование субстратов: подкислением, подщелачиванием среды или изменение pH среды не происходит. Отметьте какие среды используются бактериями с накоплением кислоты или образованием газа, укажите выделяют ли бактерии вашего штамма внеклеточные ферменты и какие, а также к каким формам относятся данные бактерии по отношению к кислороду.

7. Объясните по каким метаболическим путям возможна утилизация данных сред исследуемым штаммом (см. учебник по биохимии).

8. Сделайте предварительное заключение об использовании сред Гисса и составьте из указанных сред ряд по степени их использования: на первое место поместите наиболее усвояемую среду, на последнее - слабо или совсем не используемую. Окончательный вывод вы сможете сделать только после микроскопирования препаратов, сделанных с данных проб.

ВНИМАНИЕ ! *Всю работу необходимо проводить в стерильной зоне пламени, как указано в занятии N 3, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Необходимо соблюдать технику безопасности, как указано в занятии N 6.*

Вопросы для самопроверки

1. Что такое таксономические признаки бактерий? Для чего их изучают?
2. Какие таксономические признаки наиболее существенны в микробиологии и почему?
3. Какие признаки микроорганизмов относят к физиологическим, а какие к биохимическим?
4. Какой тип метаболизма характерен для микроорганизмов?
5. В каких процессах утилизации субстратов микроорганизмами могут образовываться органические кислоты, спирты, газообразные продукты?
6. Какими способами определяют особенности метаболизма прокариот?
7. Какие основные метаболические пути и циклы прокариот в настоящее время изучены достаточно полно? Как они называются и почему?

8. Что такое внеклеточные ферменты микроорганизмов? Какова их биологическая роль?

9. Где и каким образом осуществляется синтез экзоферментов в клетке прокариот?

10. Каковы механизмы регуляции синтеза и активности внеклеточных ферментов?

11. Используются ли экзоферменты микроорганизмов человеком в процессе жизнедеятельности? Если да, то в каких целях? Ответ поясните.

12. На какие группы делят микроорганизмы по их отношению к кислороду?

13. Какими способами выявляются аэробные и анаэробные формы прокариот?

14. Существует ли взаимосвязь между типом метаболизма и отношением клеток бактерий к кислороду? Обоснуйте свой ответ.

Занятие № 13

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА. ВЫЯВЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Выяснить морфологические особенности выделенного штамма в зависимости от среды культивирования, проверить чистоту штамма с помощью дифференциально-диагностических сред. Освоить цитохимические методы исследования: метод прижизненной окраски клеток прокариот и выявление внутриклеточных углеводных включений.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Прокариотическая клетка – это сложная живая система, характеризующаяся высокой степенью упорядоченности составляющих её структур. Каждая структура выполняет определенное жизненное назначение. Взаимодействие этих структур обеспечивает существование клетки, её целостность. В цитоплазме прокариот обнаруживаются различные включения. Одни из них рассматривают как активно функционирующие структуры (хлоросомы, фикобилисомы), другие – как продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, а откладывающиеся внутри клетки (карбоксисомы). Некоторые включения имеют приспособительное значение (магнитосомы и аэросомы), но многие из них являются запасными веществами. Накопление запасных веществ клеткой происходит в условиях избытка питательных веществ в окружающей среде, а потребление – при попадании клетки в условия голодания. У многих микроорганизмов в клетках накапливаются запасные вещества различной природы – *полисахариды, липиды, полифосфаты*, отложения элемен-

тарной серы (используется как донор электронов или источник энергии, запасается пурпурными серными бактериями) и, в некоторых случаях, *полипептиды*. Специфическим запасным веществом цианобактерий являются *цианофитиновые гранулы*. Они состоят из полипептида, содержащего аргинин и аспарагиновую кислоту в эквимолярных количествах. Гранулы появляются при культивировании цианобактерий в среде с азотом и исчезают при истощении среды по азоту. Поэтому считается, что в клетке они служат резервом данного элемента и расходуются при недостатке азота в среде.

Поскольку клетки микроорганизмов по форме не слишком разнообразны, в ряде случаев, чтобы установить их принадлежность к тому или иному роду и виду, в качестве таксономических признаков используют некоторые запасные вещества. Для изучения внутреннего строения клеток, а также для выявления запасных питательных веществ, применяют различные специальные методы окраски (цитохимические методы) той или иной структуры.

ПОЛИСАХАРИДНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Некоторым микроорганизмам свойственно накопление запасных веществ углеводной природы, обнаруживаемых в клетках чаще всего в виде гранул *гликогена*, *крахмала* или *гранулёзы*. Что касается прокариотических организмов, то принято называть эти вещества *гликогенотипными* и *крахмалотипными*, т.к. по своей химической природе они несколько отличаются от запасных веществ животных и растительных клеток.

Полисахаридные включения - это высокомолекулярные полимеры, построенные из остатков глюкозы. Чаще всего это гранулы сферической формы диаметр которых варьирует от 20 до 100 нм. Гликоген - это углевод или животный крахмал, который часто накапливается в клетках дрожжей. Для обогащения дрожжевых клеток гликогеном их выращивают на солодовой среде. Гранулёза является специфическим запасным полисахаридом анаэробных споровых бактерий группы клостридиев. В больших количествах накапливается в клетках маслянокислых бактерий (*Clostridium acetobutyricum*) перед спорообразованием.

Названные полисахариды являются широко распространённым типом запасных веществ в мире микроорганизмов. В неблагоприятных условиях они используются в качестве источника углерода и энергии.

Окраска включений

Эти вещества выявляют микрохимически при обработке клеток раствором Люголя.

Окраска крахмало- и гликогенотипных веществ. На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю суспензии клеток исследуемого микроорганизма и к ней добавляют такую же каплю раствора йода в йодистом калии.

Сверху помещают покровное стекло, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией (на покровное стекло наносят каплю масла). При этом гранулы крахмалоподобных веществ окрашиваются в синий цвет, а гранулы гликогенподобных полисахаридов - в красновато-коричневый.

Включения гликогена и гликогенподобных веществ хорошо исследовать соответственно в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus* 1-2-суточного возраста.

Окраска гранулы. На чистое предметное стекло в небольшую каплю суспензии маслянокислых бактерий добавляют небольшую каплю раствора Люголя, закрывают покровным стеклом и удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой. На покровное стекло наносят каплю масла и просматривают с иммерсионной системой.

В качестве объекта следует воспользоваться накопительной культурой маслянокислых бактерий. Для приготовления препарата маслянокислых бактерий берут пипеткой - каплю суспензии из придонного слоя жидкости.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, колба для воды, штатив, пипетка, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор Люголя, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б. ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выделенные штаммы бактерий, выращенные на средах Гисса и суспензия дрожжевых клеток, выращенных на богатой углеводной среде.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Промикроскопировать (объектив 90х) и зарисовать постоянные препараты бактерий, приготовленные на прошлом занятии. Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все формы, типы скоплений клеток и их особенности.
 2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать прижизненный препарат дрожжей (окраска раствором Люголя, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить *тип запасного вещества, его форму и расположение в клетке*. Обратить внимание на внешний вид клеток и типы скоплений.
 3. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать прижизненный препарат бактерий, выращенных на наиболее благоприятной среде Гисса (окраска раствором Люголя, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить *тип запасного вещества, его форму и расположение в клетке*. Обратить внимание на внешний вид клеток и типы скоплений.
 4. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.

5. Выбранную пробирку со средой Гисса оставить при температуре +4°C до следующего занятия. В тетради отметить условия хранения чистой культуры.
6. Пробирки с культурами на остальных средах передать лаборанту для уничтожения микрофлоры. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
7. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При микроскопировании постоянных препаратов, приготовленных на предыдущем занятии, обратите особое внимание на чистоту штамма, выращенного на исследуемых средах.

2. На основании предварительного заключения, сделанного на предыдущем занятии и проведенного микроскопирования препаратов, выберете пробирку со средой, наиболее благоприятную для развития вашего штамма и используйте её для следующей работы. Кроме того сделайте вывод о наличии в клетках штамма ферментов, которые гидролизуют используемые субстраты.

3. **ВНИМАНИЕ ! Прижизненный препарат при окраске углеводных включений следует рассматривать с иммерсией.** После микроскопирования прижизненного препарата, под рисунком сделайте вывод о типе запасного вещества в клетках вашего штамма и используйте эту характеристику при его идентификации.

4. **ВНИМАНИЕ ! Богатые углеводные среды легко засеваются микрофлорой воздуха и используются многими микроорганизмами. Поэтому от исследователя требуется тщательное соблюдение правил работы, которые позволят предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Вся работа необходимо проводить в стерильной зоне пламени, как указано в занятии N 3, соблюдая технику безопасности, указанную в занятии N 6.**

Вопросы для самопроверки

1. Какие внутриклеточные структуры характерны для клеток микроорганизмов?
2. Какие включения относятся к функциональным включениям? Какова их биологическая роль?
3. Каким образом элементарная сера в клетках прокариот выполняет роль донора электронов? В каких реакциях она участвует?
4. Какие включения называются приспособительными и почему?
5. Какую роль играют приспособительные включения в жизни клеток и при каких условиях? Обязательны ли эти структуры для бактерий?
6. Какие запасные вещества могут накапливаться в клетках микроорганизмов?
7. При каких условиях происходит накопление и утрата запасных веществ в клетках микроорганизмов? Приведите примеры.
8. Какие включения полисахаридной природы можно обнаружить в прокариотических и эукариотических клетках?

9. Что собой представляют углеводные включения микроорганизмов? Какова их химическая природа?

10. Какова биологическая роль углеводных включений? Ответ поясните.

11. На каком принципе основаны методы выявления полисахаридных включений в клетках микроорганизмов?

12. Какие запасные вещества микроорганизмов можно назвать питательными, а какие нет и почему? Ответ поясните и приведите примеры.

Занятие № 14

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЛЮТИНА И ЛИПИДНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомится и освоить цитохимические методы исследования: выявление волютина и внутриклеточных липидных включений в прокариотических и эукариотических клетках.

ВОЛЮТИН И ЛИПИДНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Волютин (метахроматические гранулы). Термин "волютин" был предложен Мейером, впервые обнаружившим окрашивающиеся гранулы у бактерий *Spirillum volutans*. Как выяснилось позже, многие микроорганизмы обладают способностью накапливать волютиновые гранулы или зерна. Их диаметр приблизительно равен 500 нм и зависит от вида микроорганизма и условий его выращивания. Характерной особенностью волютина является сходство к основным красителям и его метахромазия – способность окрашиваться в иной цвет, чем цвет окрашивающего вещества (метиленовый синий окрашивает волютин в фиолетово-красный цвет). Поэтому волютиновые гранулы часто называют метахроматическими гранулами или зернами.

Между зернами волютина и РНК легко образуются комплексы, в результате чего возникают гетерополимеры. Поэтому первоначально волютин рассматривали как запасное фосфор- и азотсодержащее вещество, производное нуклеиновой кислоты. К началу 50-х годов было установлено, что эти соединения являются полимерами, в которых молекулы ортофосфата соединены между собой фосфоангидридными связями с образованием неразветвленной линейной структуры. Поэтому, в настоящее время, данные клеточные включения принято называть *полифосфатами*.

Считается, что полифосфаты – это не просто депо фосфора, а макроэргические соединения – универсальной функцией которых является резервирование внутри клеток значительного количества активированного фосфата.

Установлено, что при гидролизе каждой фосфоангидридной связи полифосфата выделяется такое же количество энергии, как при отщеплении терминального фосфата от АТФ. Кроме этого, установлено их участие в активном транспорте Сахаров у *N. crassa* и в процессе спорообразования у грибов. В последние годы интенсивно обсуждается возможная роль высокомолекулярных полифосфатов в регуляции уровня содержания в клетках ортофосфата, АДФ, АТФ, других йшкроэргических фосфорных соединений, а через них и в регуляции самых разнообразных метаболических процессов.

Как правило, в молодых клетках полифосфата накапливается больше. У эубактерий и актиномицетов его гранулы локализованы в цитоплазме, у дрожжей и грибов - в вакуолях.

Его легко выявить окраской по способу Омелянского, метод основан на плохой растворимости полифосфатов в растворах кислот.

Липидные (или жировые) включения. Гранулы и капельки жира часто встречаются в клетках микроорганизмов. Они накапливаются в виде гранул с диаметром 100-1000 нм, окруженных однослойной белковой оболочкой толщиной 2-3 нм. Гранулы резко преломляют свет и поэтому хорошо различимы на препаратах в световом микроскопе.

У прокариотических организмов основу этого запасного вещества составляет полимер Р-оксисаляной кислоты (98% полимера кислоты и 2% белка). У некоторых бактерий, окисляющих углеводороды, данная кислота составляет до 70% сухого вещества клеток. Большое количество поли-р-оксибутирата накапливается в клетках бацилл.

Липидные включения содержатся в клетках практически всех видов микроорганизмов и запасаются в качестве источника углерода и энергии. Особенно много их накапливается при старении культуры, при культивировании микроорганизмов на средах с органическими кислотами, или на средах, несбалансированных по углероду и азоту, когда отношение С к N больше 10.

Для выявления жироподобных веществ используют липофильные красители - судан 3 или судан черный В - индикаторы жироподобных веществ.

Выявление включений в клетках микроорганизмов

Окраска полифосфатов по методу Омелянского. Окраска основана на плохой растворимости метахроматических гранул в растворах кислот.

На обезжиренном предметном стекле готовят тонкий мазок бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На фиксированный мазок наливают карболовый фуксин Циля и окрашивают клетки в течение 30 сек. Краску сливают, препарат промывают водой и заливают 1%-ным раствором серной кислоты на 20-30 сек для обесцвечивания. Кислоту сливают, препарат промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим (1 : 40) в течение 20-30 сек. Препарат еще раз промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном

окрашивании зерна волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы клеток бактерий.

Для выявления волютина у *дрожжей* обычно применяют следующий способ. Фиксированный над пламенем горелки мазок окрашивают метиленовым синим (по Лёффлеру) в течение 3 мин. Краску сливают, препарат промывают водой и, не высушивая, наносят на мазок небольшую каплю 1%-ного раствора серной кислоты; суспензию накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют. Волютин имеет вид капель сине-фиолетового цвета на слабо-голубом фоне цитоплазмы.

Окраска липидных включений. В световом микроскопе капельки жира можно выявить по более сильному преломлению света, чем окружающая их цитоплазма. В каплю воды на предметное стекло вносят культуру дрожжей, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. В клетках дрожжей просматриваются крупные капли жира, сильно преломляющие свет.

Липидные включения у бактерий легче выявляются на окрашенных препаратах. Чаще всего используют липофильные красители - судан 3 или Судан черный В. Существует несколько способов окраски данных включений: при одном окрашиваются живые клетки, при другом - фиксированные.

1-й способ. На предметном стекле к капле водной суспензии клеток добавляют каплю раствора Судана 3 (растворённого в молочной кислоте). Суспензию накрывают покровным стеклом, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой и микроскопируют. Судан 3, растворяясь в жировых включениях, окрашивает их в оранжево-красный цвет, а цитоплазма клеток остается бесцветной.

2-й способ. Готовят препарат клеток 24-часовой культуры. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. Затем заливают поверхность мазка раствором Судана черного В и оставляют краситель на стекле на 5-15 мин. (Краситель может высохнуть, но это не мешает окраске.) Затем краситель сливают, препарат подсушивают фильтровальной бумагой и просветляют в ксилоле, погружая в него несколько раз предметное стекло. *
Время просветления не должно превышать 1 мин. После этого клетки дополнительно окрашивают 0,1%-ным водным раствором сафранина в течение 10 сек. Более длительное окрашивание сафранином маскирует окраску жира (дополнительное окрашивание клеток сафранином необязательно). Препараты микроскопируют с иммерсионной системой. Жироподобные вещества окрашиваются в темный цвет, а цитоплазма в розовый.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, колба для воды, штатив, пипетка, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная

Г смесь, иммерсионное масло, карболовый фуксин Циля, метиленовый синий (1 : 40) и метиленовый синий по Лёффлеру, судан 3, 1%-й раствор H_2SO_4 , вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочки сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выделенный штамм бактерий, выращенный на среде Гисса, старые культуры дрожжей и бацилл.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянные препараты дрожжевых клеток и выделенных бактерий (окраска по Омелянскому, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить наличие или отсутствие *запасного вещества, его форму и расположение в клетках*. Обратить внимание на внешний вид клеток и типы скоплений.
 2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать прижизненный препарат дрожжей (без окраски, объективы 40х и 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить наличие или отсутствие *запасного вещества, его форму и расположение в клетках*. Обратить внимание на внешний вид клеток и типы скоплений.
 3. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать прижизненные препараты дрожжей и бактерий штамма, (окраска раствором, Судана 3, объективы 40х и 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить *тип запасного вещества, его форму и расположение в клетке*. Обратить внимание на внешний вид клеток и типы скоплений.
 4. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
 5. Штамм в пробирке со средой Гисса оставить при температуре +4°C до следующего занятия. В тетради отметить условия хранения чистой культуры.
 6. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 7. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. После микроскопирования препаратов, под рисунками сделайте выводы о типе запасного вещества в клетках вашего штамма и используйте эти характеристики при его идентификации.

2. **ВНИМАНИЕ !** Богатые углеводные среды легко засеваются микрофлорой воздуха и используются многими микроорганизмами. Поэтому от исследователя требуется тщательное соблюдение правил работы, которые позволяют предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Вся работа необходимо проводить в стерильной зоне пламени, как указано в занятии N 3, соблюдая технику безопасности, указанную в занятии N 6.

ВНИМАНИЕ (Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами.

Поскольку в методах используются сильные окрашивающие соединения, окраску препаратов следует проводить осторожно, поместив препарат на стеклянный мостик строго над центром кристаллизатора.

Работать необходимо внимательно, аккуратно, тщательно и не отвлекаясь, т.к. удаление красителей с окружающих предметов затруднительно, а с тканей одежды - невозможно.

Вопросы для самопроверки

1. Что собой представляет волютин? Как ещё называется это включение и почему?
2. Какова химическая природа волютина?
3. Какова биологическая роль волютина в клетках микроорганизмов?
4. Можно ли выявить в клетках прокариот зерна волютина без специального окрашивания? Если можно, то каким образом?
5. Какие липидные включения можно обнаружить в клетках прокариот и эукариот?
6. Что собой представляют липидные включения? Какова их химическая природа?
7. Какова биологическая роль липидных включений в клетках?
8. Можно ли выявить липидные включения у маслянокислых клостридий без специального окрашивания? Если можно, то каким образом?
9. На каком принципе основаны методы выявления полифосфатных и липидных включений в клетках микроорганизмов?
10. Могут ли в клетках микроорганизмов одновременно накапливаться несколько видов запасных веществ? Ответ поясните и приведите примеры.
11. При каких условиях происходит накопление и утрата запасных веществ в клетках микроорганизмов?
12. Встречаются ли в природе клетки микроорганизмов, не содержащие запасных веществ? Ответ поясните.
13. В каких клетках может быть больше запасных веществ - в физиологически молодых или физиологически старых и почему? Ответ поясните.
14. С какой целью проводят выявление внутриклеточных включений в клетках микроорганизмов?

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭНДОСПОР – ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ ПРОКАРИОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться и освоить цитохимические методы исследования эндоспор и выявление данных структур различными способами в прокариотических клетках.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОСПОР

Бактериальные эндоспоры – это особый тип покоящихся клеток фирмикутных эубактерий. Формирование эндоспор осуществляется эндогенно, т.е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки (*спорангия*). Они обладают специфическими структурами – многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембраной и кортексом, а протопласт споры содержит мало свободной воды. Поэтому для них свойственно особое физическое состояние – процессы жизнедеятельности в них сильно заторможены. Эндоспоры легко переносят высушивание, длительное кипячение и обладают значительной устойчивостью к высоким температурам и дозам радиации, летальным в норме для вегетативных клеток.

Спорообразование обычно происходит при исчерпании питательного субстрата и обогащения его продуктами жизнедеятельности, а также при неблагоприятных условиях кислотности среды, температуре, давлении, наличие в среде ряда химических соединений и т.д. Как правило, в клетке образуется одна эндоспора, поэтому, по мнению большинства исследователей, эндоспоры образуются не для размножения, а для перенесения неблагоприятных условий. При попадании в благоприятные условия, споры прорастают и каждая из них дает одну вегетативную клетку.

Различают три типа спорообразования: бациллярный, клостридиальный и плектридиальный.

Бациллярный тип характеризуется тем, что форма клетки перед спорообразованием не меняется и спора может располагаться в любой части клетки: в центре клетки, эксцентрично, субтерминально или терминально, что зависит от вида микроорганизма. Такой тип спорообразования свойственен представителям рода *Bacillus*.

Клостридиальный тип характеризуется тем, что середина клетки перед спорообразованием расширяется и клетка приобретает вид челнока или веретена. В этом случае спора располагается в центре клетки.

Плектридиальный тип характеризуется тем, что клетка перед спорообразованием расширяется на одном конце и приобретает вид барабанной палочки или теннисной ракетки. Естественно спора располагается в расширенном конце клетки.

Клостридиальный и плектридиальный типы спорообразования свойственны представителям рода *Clostridium*. Нередко у клеток одного вида встречаются одновременно и клостридии и плектридии.

К спорообразующим организмам относится большое число эубактерий (приблизительно из 15 родов), характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием. Среди них имеются палочковидные, сферические, мицелиальные формы, спириллы и нитчатые организмы. Все они имеют строение клеточной стенки, характерное для таковой фирмикутных эубактерий. Ни в одном случае не выявлена наружная липопротеиновая мембрана, несмотря на то, что многие виды спорообразующих бактерий не окрашиваются по Граму. По типу питания среди них обнаружены хемоорганогетеротрофы, факультативные хемолитоавтотрофы и паразитические формы. Отношение к кислороду также разнообразно: часть спорообразующих форм представлена аэробами и факультативными анаэробами, другая часть включает облигатных анаэробов - от аэротолерантных форм до высокочувствительных к O_2 .

Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*, хотя имеющиеся данные позволяют сделать вывод о принципиальной однотипности этого процесса у всех видов, образующих эндоспоры.

Выявление спор у бактерий

Обнаружение способности культуры к спорообразованию лучше проводить в старых культурах. Для определения способа спорообразования и расположения споры в клетке следует проводить наблюдения в динамике развития культуры.

Споры у бактерий можно выявить при микроскопировании препарата "раздавленная капля" в светлом поле. Поскольку споры преломляют свет сильнее, чем остальная часть клетки, то в клетке они видны как более темные включения округлой или овальной формы. Однако значительно лучше для выявления спор использовать фазово-контрастное устройство. В этом случае споры имеют вид светлых (блестящих) включений на фоне почти черных клеток.

Кроме этого споры можно обнаружить, применяя методы окраски. При обычных способах окраски споры не прокрашиваются или окрашиваются очень слабо и имеют вид светлых включений на фоне окрашенной цитоплазмы, а свободные споры, т. е. споры, находящиеся вне клетки, напоминают маленькие кольца. Поэтому для окраски спор препарат обрабатывают концентрированными растворами красителей с протравами при нагревании. Все имеющиеся способы окраски спор основаны на том, что первоначально сильным красителем с прогреванием красят одновременно клетку и спору. Затем протоплазму клетки обесцвечивают, оставляя спору окрашенной. После этого

протоплазму красят дополнительно в другой, чаще всего, контрастный цвет. Наибольшее распространение получили способы Ожешки и Пешкова.

Способ Ожешки. На обезжиренном предметном стекле готовят тонкий мазок бактерий, высушивают его на воздухе, не фиксируя, заливают 0,5%-ным раствором соляной кислоты и подогревают в течение 2 мин, держа высоко над пламенем горелки до появления паров.

Кислоту сливают, препарат промывают водой, мазок закрывают фильтровальной бумагой и заливают карболовым фуксином Циля. Окрашивают в продолжении 5 мин при нагревании над пламенем горелки до появления паров. По мере испарения красителя его периодически добавляют, не давая препарату подсохнуть.

Препарат вновь промывают водой и обрабатывают в течение 2 мин 1%-ным раствором серной кислоты для обесцвечивания. Время обесцвечивания в зависимости от особенностей клеток может несколько колебаться. Поэтому для разных микроорганизмов желательно определять время обесцвечивания опытным путем.

Препарат еще раз промывают водой и докрашивают раствором метиленового синего 1: 40 в течение 10-15 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и затем микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании бактериальные клетки должны быть синими, а споры красными.

Способ Пешкова. На обезжиренном предметном стекле готовят тонкий мазок бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На фиксированный мазок наливают раствор метиленового синего (по Лёффлеру) и доводят его до кипения, держа препарат над пламенем горелки. Кипятят в течение 15-20 сек. По мере испарения раствора метиленового синего добавляют новые порции красителя.

Препарат тщательно промывают водой, после чего клетки докрашивают 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного в течение 30 сек. Краситель сливают, препарат вновь промывают дистиллированной водой, высушивают и смотрят с иммерсионной системой. При правильном соблюдении всех стадий обработки и окрашивания препарата бактериальные клетки приобретают красный цвет, а споры синий.

В случае обнаружения у микроорганизма способности к образованию спор необходимо отмечать тип спорообразования (бацилярный, клостридиальный или плектридиальный), расположение споры в клетке (центральное, эксцентриальное или полярное), форму свободных спор (круглая, эллипсоидная или продолговатая) и их размеры.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, колба для воды, штатив, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное "масло, карболовый фуксин Циля, метиленовый синий (1: 40) и метиленовый синий по Лёффлеру, 0,5%-ный раствор HCl, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги), пробирка со скошенным рыбно-пептонным агаром (РПА).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: старые культуры бактерий и выделенный штамм бактерий (если предположительно спорообразующий).

- ЗАДАНИЕ:** 1. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянные препараты *Bacillus sp.* и выделенных бактерий (окраска по Ожешки, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить вегетативные клетки, клетки-спорангии, свободные эндоспores. Обратить внимание на внешний вид клеток, *форму и расположение спор в клетках*.
2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянные препараты *Bacillus sp.* и выделенных бактерий (окраска по Пешкову, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить вегетативные клетки, клетки-спорангии, свободные эндоспores. Обратить внимание на внешний вид клеток, *форму и расположение спор в клетках*.
3. Промикроскопировать и зарисовать демонстрационный препарат *Bacillus sp.* (окраска водный фуксин, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить вегетативные клетки, клетки-спорангии, свободные эндоспores. Обратить внимание на внешний вид клеток, *форму и расположение спор в клетках. Отметить цвет цитоплазмы клеток и эндоспор*.
4. Промикроскопировать и зарисовать демонстрационный препарат *Bacillus sp.* (окраска по методу Шеффера-Фултона, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить вегетативные клетки, клетки-спорангии, свободные эндоспores. Обратить внимание на внешний вид клеток, *форму и расположение спор в клетках. Отметить цвет цитоплазмы клеток и эндоспор*.
5. Пересеять часть клеток, штамма в пробирку на стерильный скошенный РПА, подписать пробирку и поместить в термостат при заданной температуре. В тетради отметить условия оживления и выращивания чистой культуры.
6. Отчитаться в выполнении задания перед преподавателем.
7. Штамм в пробирке со средой Гисса оставить при температуре +4°C до выращивания оживленной культуры.
8. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
9. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При протравливании и окраске препаратов с нагреванием, предметное стекло необходимо удерживать пинцетом.

2. Нагревать следует всю поверхность стекла **осторожно**, чтобы оно не треснуло. *Периодически стекло отводят в сторону от пламени, для того чтобы проследить за появлением паров над препаратом. В это время препарат следует держать над кристаллизатором.*

3. После нагревания препарата, поместите стекло на препаратодержатель и немного подождите пока Оно остынет, а только затем промойте его водой.

ВНИМАНИЕ ! *Окраску препаратов следует проводить осторожно, поместив препарат на стеклянный мостик строго над центром кристаллизатора. Если потребуется добавить краситель на стекло, эту процедуру также необходимо проделывать над кристаллизатором. Во время нагревания препарата следите, чтобы не загорелась фильтровальная бумага с красителем !*

4. Под рисунками сделайте выводы о типе спорообразования, форме свободных эндоспор, особенностях расположения спор в клетках бацилл и вашего штамма и используйте эти характеристики при его идентификации.

ВНИМАНИЕ (Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около или в пламени горелки ! Работу следует проводить по возможности быстро, аккуратно и не отвлекаясь. Поскольку в методах используются концентрированные окрашивающие соединения, **окраску препаратов следует проводить внимательно и осторожно, поместив препарат на стеклянный мостик (или держка его) строго над центром кристаллизатора, т. к. удаление красителей с окружающих предметов затруднительно, а с тканей одежды - невозможно.**

Работать необходимо внимательно, не отвлекаясь и не отвлекая других, соблюдая технику безопасности, указанную в занятии N 6.

Вопросы для самопроверки

1. Что собой представляют споры микроорганизмов? Чем от них отличаются эндоспоры?

2. Каково строение эндоспор бацилл и клостридий? Существуют ли между ними различия?

3. Какова химическая природа и функции различных структур эндоспор?

4. Какова биологическая роль эндоспорообразования в природе?

5. Можно ли выявить в клетках прокариот эндоспоры без специального окрашивания? Если можно, то каким образом?

6. Какие свойства характерны для данных структур?

7. Какие группы бактерий способны их образовывать?

8. При каких условиях происходит процесс в клетках микроорганизмов?

9." Как происходит образование эндоспор в клетках? Чем отличаются типы спорообразования?

10. Как детерминирован данный процесс: его обратимость и необратимость?

11. В каких клетках может происходить образование эндоспор - в физиологически молодых или физиологически старых и почему? Ответ поясните.

12. На каком принципе основаны методы выявления эндоспор?

13. Могут ли в клетках микроорганизмов одновременно образовываться несколько спор? Ответ поясните и приведите примеры.

14. Встречаются ли в природе клетки микроорганизмов, не образующие спор? Ответ поясните.

15. С какой целью проводят выявление спор в клетках микроорганизмов и их изучение?

16. Как объяснить высокую устойчивость эндоспор к действию факторов окружающей среды? Ответ поясните и приведите примеры.

Занятие № 16

КОЛЛОКВИУМ.

ПОСЕВ БАКТЕРИЙ НА СРЕДЫ С ДИСК-АНТИБИОТИКАМИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепление и проверка усвоения лекционного материала, теоретического и практического материала практикума. Освоение метода посева бактерий на плотные среды с диск-антибиотиками.

КОЛЛОКВИУМ: *по всему пройденному материалу.*

Для подготовки к коллоквиуму необходимо повторить теоретический материал по особенностям строения и функционирования клеток микроорганизмов; способам размножения и спорообразования; особенностям строения и образования эндоспор; особенностям метаболизма прокариот в отличие от эукариот. Повторить методы изучения клеток микроорганизмов: биохимические и цитохимические.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики (от анти... и греч. *bios* – жизнь) – это вещества биологического происхождения, синтезируемые микроорганизмами и подавляющие рост других микроорганизмов и клеток. Явление антагонизма было впервые показано английским бактериологом А.Флемингом в 1929г. Мысль об использовании явления антагонизма в микромире для подавления болезнетворных бактерий принадлежит И.И.Мечникову. Он предложил употреблять молочнокислые бактерии, обитающие в простокваше, для подавления вредных гнилостных бактерий, обитающих в кишечнике человека.

До 40-х гг. 20в. антибиотики, обладающие лечебным действием, не были выделены в чистом виде из культур микроорганизмов. Первым таким анти-

биотиком был тиротрицин, полученный американским ученым Р.Дюбо в 1939г. из культуры почвенной споровой аэробной палочки *Bacillus brevis*. В 1940г. английские ученые Х.Флори и ДЖ.Чейн, работая с пенициллином, образующим плесневый грибок *Penicillium notatum*, впервые выделили пенициллин в чистом виде и обнаружили его замечательные лечебные свойства. В настоящее время описано несколько тысяч антибиотиков из культур микроорганизмов. Они образуются преимущественно прокариотическими организмами. Большую часть применяемых в настоящее время антибиотиков образуют эукариотициды (старое название - лучистые грибки).

Высокая избирательная биологическая активность в отношении болезнетворных форм в концентрациях, не повреждающих клеток организма хозяина, позволила использовать эти вещества для уничтожения возбудителей болезней или хотя бы заметного подавления их жизнедеятельности при лечении различных инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Каждый антибиотик характеризуется специфическим избирательным действием только на определенные виды патогенных бактерий, поэтому различают антибиотики с широким и узким спектром действия.

В процессе производства препараты антибиотиков подвергаются сложной химической очистке. Многие из этих препаратов в настоящее время являются веществами известной химической природы, свойства которых досконально изучены. В лечебную сеть препараты антибиотиков поступают только после тщательного контроля их активности, безвредности, стерильности и других показателей качества.

Техника посева бактериальной культуры с диск-антибиотиками

Наиболее прост и доступен метод определения чувствительности с помощью дисков, пропитанных различными антибиотиками.

В стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, разливают по 15 мл плотной питательной среды. На поверхность застывшего и слегка подсушенного агара стерильно вносят 0,5-1 мл суспензии суточной культуры исследуемых бактерий или, если чистая культура не выделена, взятого для исследования патологического материала (гной, экссудат и т.п.), слегка разведенного изотоническим раствором хлорида натрия. Бактериальную взвесь равномерно распределяют по поверхности агара стерильным шпателем. После этого на поверхности засеянной среды стерильным пинцетом раскладывают диски с антибиотиками - по 5-6 дисков на каждую чашку на расстоянии 25 мм от центра чашки. Чашки выдерживают при 37° С 16-18 час, после чего учитывают результаты опыта путем измерения зон задержки роста микробов вокруг дисков.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, плитка для плавления среды, термостат, кристаллизатор со стек-

лянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, штатив, пробирка (со стерильным физ. раствором), стерильная чашка Петри, стерильная пипетка, стерильный шпатель Дригальского, бактериологическая петля.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: РПА, 96°этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б. ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка, полоски фильтровальной бумаги), диск-антибиотики.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выросшие чистые культуры в пробирках.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Разлить расплавленную стерильную питательную среду в стерильные чашки Петри в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрыть и чашку оставить на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.
 2. Провести микроскопический контроль чистоты оживленного штамма: приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянный препарат бактерий (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все формы, типы скоплений клеток и их особенности. *Отметить степень чистоты штамма.*
 3. В стерильных условиях, внести 1-2 бактериологической петли клеток в пробирку с физиологическим раствором. Засеянную пробирку поворачивать несколько раз, зажав между ладонями.
 4. 0,2-0,5 мл клеточной суспензии перенести стерильной пипеткой на стерильную питательную среду в чашку Петри и распределить клетки стерильным шпателем.
 5. Поместить на среду с культурой диски с антибиотиками как указано выше. Чашки завернуть в бумагу, надписать свою фамилию и дату посева, поместить их в термостат при заданной температуре. В тетради отметить условия инкубирования культуры.
 6. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем: показать приготовленные препараты и выполненные рисунки.
 7. Пробирки с со штаммами на среде Гисса передать лаборанту для уничтожения микроорганизмов.
 8. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
 9. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Методические указания

1. При микроскопировании препарата особое внимание обратите на однородность клеток по форме и размерам, т.е. на чистоту культуры.
2. При разведении культуры физиологическим раствором, учитывайте

технику пересева бактерий из пробирки в пробирку, как указано в занятии №8.

ВНИМАНИЕ ! При взятии материала пробирки необходимо удерживать в наклонном положении, чтобы гарантировать стерильность культуры. Если их держать вертикально, то возможно попадание посторонних клеток микроорганизмов.

3. В стерильных условиях развернуть шпатель, слегка обжечь в пламени спиртовки и, приоткрыв крышку чашки, студить его о её внутреннюю поверхность. Осторожно распределить клетки шпателем сначала по одной половине поверхности среды, затем по второй.

4. Быстро обжечь пинцет в пламени и в стерильных условиях поместить на среду диски с антибиотиками.

ВНИМАНИЕ ! Техника безопасности. Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки (но не в пламени!) по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около проводящего посев микроорганизмов, так как движение воздуха увеличивает случайность загрязнения культуры.

Вопросы для самопроверки

1. Какие формы взаимоотношений существуют между микроорганизмами? Приведите примеры.
2. Дайте определение симбиозу, конкуренции, антагонизму, паразитизму, хищничеству.
3. Что такое антибактериальные вещества? Каково их происхождение?
4. Какова их химическая природа?
5. Какие микроорганизмы могут их вырабатывать?
6. Какова роль этих веществ в жизнедеятельности микроорганизмов?
7. Какие типы классификаций антибиотических веществ вам известны?
8. Где находят применение антибиотические препараты?
9. Что собой представляют диск-антибиотики? С какой целью их применяют?

Занятие № 17

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться и освоить метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам с помощью дисков.

УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Примерно 50 лет назад началась эра применения антибиотиков в медицине. Поиск новых антибиотиков продолжается с прежней интенсивностью, однако частота их обнаружения резко снизилась. Кроме того, с угрожающей скоростью стали появляться штаммы патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам. В то время, когда пенициллин G только начал применяться в медицине, большинство штаммов стафилококков были к нему чувствительны, а в настоящее время практически все известные стафилококковые инфекции устойчивы к этому антибиотику. Ещё более важная проблема - появление штаммов бактерий, устойчивых одновременно к нескольким антибиотикам, так называемых *штаммов с множественной устойчивостью*. Например, с 1954 по 1964г. частота встречаемости штаммов *Shigella* с таким свойством в больницах Японии увеличилась с 0,2 до 52%.

Устойчивость бактерий к антибиотикам обусловлена многими факторами. Иногда она обусловлена мутацией в хромосомном гене, которая изменяет структуру мишени в клетке. Например, стрептомицин нарушает синтез белка в микроорганизме, прикрепляясь к одному из белков ЗОБ-субъединицы рибосомы. Некоторые мутации в гене, кодирующем этот рибосомный белок, нарушают его способность связывать стрептомицин, но не влияют существенным образом на работу рибосомы. Поэтому клетка с подобной мутацией становится устойчивой к стрептомицину.

Устойчивость может быть обусловлена и проникновением в бактериальную клетку плазмиды, принадлежащей к классу *факторов резистентности (R-факторы)*. Эти плазмиды часто обеспечивают устойчивость одновременно к нескольким антибиотикам. Они несут гены, кодирующие ферменты, которые катализируют химические модификации антибиотиков, лишая их, таким образом антибиотической активности. Множественная устойчивость штаммов бактерий почти всегда обусловлена R-факторами. Поскольку эти плазмиды имеют широкий спектр хозяев и достаточно часто передаются от одного вида бактерий к другому, их распространение в естественных бактериальных популяциях, безусловно, самый серьезный аспект проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Кроме этого, большие дозы ряда антибиотических препаратов оказывают побочное действие на макроорганизм. Установлено, что большие дозы пенициллина и стрептомицина оказывают нейротоксическое действие, тетрациклины вызывают поражение печени, хлормицетин обуславливает токсическое действие на кроветворные органы, хлортетрациклин и окситетрациклин при внутривенном введении могут привести к коллапсу со смертельным исходом. При введении пенициллина и стрептомицина могут появиться крапивница, контактные дерматиты, ангионевротический отёк, аллергическая язва и т.д.

Таким образом, для успешного проведения лечения антибиотиками, особенно в случаях хронической инфекции, необходимо предварительно определить степень чувствительности возбудителя заболевания к тем или иным антибиотическим препаратам. При определении чувствительности желательно иметь чистые культуры возбудителя и, лишь при необходимости срочного получения ответа, используют смешанные культуры, содержащие всю микрофлору, имеющуюся в исследуемом материале.

Техника определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

После роста культуры на чашках с диск-антибиотиками проводят измерение зон задержки роста микроорганизмов вокруг диска, включая диаметр самого диска, и результат выражают в мм. Естественно, что размер зон зависит от степени чувствительности возбудителя к данному антибиотику. Чем больше площадь зоны задержки роста, тем чувствительнее культура к данному антибиотику.

Принято считать, что при зоне диаметром до 10 мм штамм расценивается как устойчивый, 11-15 мм - как малоустойчивый, 15-25 мм - как чувствительный. Зоны, превышающие 25 мм, свидетельствуют о высокой чувствительности микроорганизма к данному антибиотику. Однако этот метод нельзя считать количественным.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, удлинитель с розетками, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы для воды и красителей, колба для воды, штатив, бактериологическая петля, песочные часы.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, иммерсионное масло, раствор водного фуксина, вода для приготовления и промывания препарата, коробок спичек, х/б. ткань для микроскопа, набор для приготовления препаратов (предметные стекла, кусочек сухого мыла, х/б тряпочка для стекол, полоски фильтровальной бумаги).

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: выделенные штаммы бактерий в чашках на РПА с диск-антибиотиками.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Проанализировать визуально рост культуры на чашке. Отметить и измерить зоны задержки роста клеток вокруг дисков.
 2. Приготовить, промикроскопировать и зарисовать постоянные препараты бактерий, выросших вокруг дисков и вокруг зон задержки роста (окраска водным фуксином в течение 3-5 мин, объектив 90х). Просмотреть не менее 10-ти полей зрения, отметить все *формы и типы скоплений клеток, их особенности*. Полученные результаты оформить в виде таблицы (см. ниже).

3. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем: показать приготовленные препараты и выполненные рисунки.
4. Чашки с выросшими культурами передать лаборанту для уничтожения микрофлоры.
5. Промикроскопированные препараты поместить в кристаллизатор с дезинфицирующим раствором.
6. Убрать свое рабочее место и сдать его лаборанту.

Вопросы для самопроверки

1. Что такое антибактериальная устойчивость микроорганизмов?
2. Что такое множественная лекарственная устойчивость?
3. Каковы механизмы формирования устойчивости бактерий к лекарственным препаратам?
4. Какие микроорганизмы считаются нечувствительными, малочувствительными, чувствительными и высокочувствительными к антибактериальным веществам?
5. Почему определение чувствительности возбудителя инфекции к антибиотикам следует проводить до начала лечения этими препаратами? Ответ поясните.

Занятие № 18

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ. НАПИСАНИЕ ОТЧЕТА О ВЫДЕЛЕНИИ ДИКОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ И ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Освоить метод обработки микробиологической лаборатории после работы с микроорганизмами. Научиться анализировать и обобщать полученные данные оформлять полученные результаты исследований в виде научной статьи.

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выяснение систематического положения микроорганизмов, полученных в чистой культуре, часто является необходимым условием для проведения с ним дальнейшей работы. Однако определение видовой принадлежности у многих микроорганизмов представляет собой достаточно трудную исследовательскую задачу, выполнение которой требует определенного навыка работы. Оно включает изучение целого ряда особенностей микроорганизмов: морфологии клеток, характера роста культуры на различных средах, способности использовать те или иные соединения, отношения к температуре, кислотно-щелочной среде, кислороду. Кроме того, для определения вида у микроорганизмов часто необходимо знать продукты обмена веществ, серологические

6. Досон Р., Эллиота Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544С.

7. Гэйл Э., Кандлифф Э., Рейнолдс П., Ричмонд М., Уоринг М. Молекулярные основы действия антибиотиков. М.: Мир, 1975. 504с.

Занятие № 18

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ. НАПИСАНИЕ ОТЧЕТА О ВЫДЕЛЕНИИ ДИКОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ И ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Освоить метод обработки микробиологической лаборатории после работы с микроорганизмами. Научиться анализировать и обобщать полученные данные оформлять полученные результаты исследований в виде научной статьи.

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выяснение систематического положения микроорганизмов, полученных в чистой культуре, часто является необходимым условием для проведения с ним дальнейшей работы. Однако определение видовой принадлежности у многих микроорганизмов представляет собой достаточно трудную исследовательскую задачу, выполнение которой требует определенного навыка работы. Оно включает изучение целого ряда особенностей микроорганизмов: морфологии клеток, характера роста культуры на различных средах, способности использовать те или иные соединения, отношения к температуре, кислотности среды, кислороду. Кроме того, для определения вида у микроорганизмов часто необходимо знать продукты обмена веществ, серологические свойства, нуклеотидный состав клеток и ряд других признаков. Это бывает сопряжено с длительными наблюдениями, постановкой специальных опытов и проведением сложных биохимических анализов. Следует иметь в виду, что расширение знаний в области цитологии, биохимии и генетики микроорганизмов неизбежно приводит к введению новых признаков (или признака) для установления сходства или различия между организмами. Поэтому в настоящей лабораторной работе определение микроорганизмов до вида не рассматривается.

Некоторые особенности роста микроорганизмов на плотных питательных средах, изучение морфологии клеток, их внутриклеточных включений, окраска по Граму, изучение ферментативных активностей, как правило, достаточно для установления принадлежности выделенного микроорганизма к определенному порядку, семейству, иногда даже роду. Таксономическое по-

ложение микроорганизмов устанавливают, пользуясь Bergey's Manual of Systematic Bacteriology или "Кратким определителем Берги" выпущенным в 1980г.

ОБОРУДОВАНИЕ: МИКРОСКОП С-11, осветитель ОИ-31, футляры для объективов и осветителя, термостат, кристаллизатор со стеклянным мостиком, спиртовка, капельницы, колба, чашки Петри, пробирки, штатив, бактериологическая петля, резиновые перчатки, ёршики для мытья посуды.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 96° этиловый спирт, спирт-эфирная смесь, раствор хлорамина, кусок сухого мыла, сода, х/б ткань для мытья стен, окон, столов, нихромовая проволока.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ: оборудование, посуда и микробиологическая лаборатория.

- ЗАДАНИЕ:**
1. Протереть линзы объектива, окуляра и осветителя спирт-эфирной смесью и поместить в футляры. Микроскоп протереть и подготовить к хранению.
 2. Изготовить из нихромовой проволоки новые петли и вставить их в держатели.
 3. Протереть столы, стены, окна, термостаты дезинфицирующими растворами.
 4. Вымыть стеклянную посуду, сполоснуть дистиллированной водой и поместить в сушильный шкаф.
 5. Сдать приборы, петли, посуду и отчитаться о выполнении задания перед лаборантом.
 6. Ознакомиться со структурой научных статей в биологических журналах, например, «Микробиология», «Биохимия», и т. п.
 7. Написать черновой вариант раздела отчета «Методы исследований».
 8. Отчитаться о выполнении задания перед преподавателем: подписать и сдать пробирки с чистыми культурами.

Методические указания

1. Чтобы успешно подготовить микроскоп к хранению, изготовить бактериологические петли, провести обработку бактериологической лаборатории дезинфицирующими средствами, воспользуйтесь рекомендациями, изложенные в занятиях №1 и 3.

2. Для написания отчета используйте все результаты, которые были записаны по ходу работы и подробно опишите выделенные и изученные микроорганизмы.

3. В результатах обязательно укажите откуда был выделен штамм, дату и время выделения.

Особенности морфологии и цитологии клеток:

- температура культивирования..., возраст...
- форма и размеры клеток..., возраст..., среда....
- соединение клеток....
- подвижность..., возраст..., среда...

- образование спор...
- вид спорообразования...
- температура культивирования..., возраст...
- расположение спор в клетке..., размеры...
- запасные вещества..., возраст..., среда...
- окраска по Граму..., возраст...

Особенности роста на плотной среде:

- описание колонии... среда..., температура культивирования..., возраст...
- рост по штриху..., среда..., температура культивирования..., возраст...

Физиолого-биохимические признаки:

- проверен рост на следующих углеводах и спиртах...
- из них используются:.... с образованием кислот..., с образованием газа...
- способ использования углеводов (аэробное окисление или сбраживание)...
- гидролиз крахмала...
- разжижение желатины..., форма разжижения...
- отношение к кислороду...

3. Для оформления отчета воспользуйтесь методическими указаниями "Оформление курсовых и дипломных работ по специальности Биология", опубликованными Куйбышевским госуниверситетом в 1991г.

Библиографический список

1. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. М.: МИР, 1980. 496 С.
1. Лябинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 394 С.
2. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1971. 222 С.
3. Практикум по микробиологии. /Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1976. 307 С.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. /Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464 С.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimor, Hong Kong, London, Sydney. 1989. Vol. 1-4.

СОДЕРЖАНИЕ

Занятие № 11 ПОСЕВ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ	4
Занятие № 12 ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ	8
Занятие № 13 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА. ВЫЯВЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ	13
Занятие № 14 ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЛЮТИНА И ЛИПИДНЫХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ	17
Занятие № 15 ВЫЯВЛЕНИЕ ЭНДОСПОР – ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ ПРОКАРИОТ	22
Занятие № 16 КОЛЛОКВИУМ. ПОСЕВ БАКТЕРИЙ НА СРЕДЫ С ДИСК- АНТИБИОТИКАМИ	27
Занятие № 17 ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВЫДЕЛЕННОГО ШТАММА	30
Занятие № 18 ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ ЗАНЯТИЕ. НАПИСАНИЕ ОТЧЕТА О ВЫДЕЛЕНИИ ДИКОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ И ЕГО ИДЕНТИФИКАЦИИ	34