

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»**

Институт дополнительного образования

«Утверждаю»

Проректор по непрерывному
профессиональному образованию
Тамбовского государственного
университета имени Г.Р. Державина



И.В. Аверина

« 6 » ноября 2020 г.

**Дополнительная профессиональная программа
повышения квалификации**

Наименование программы: «Санитарная микробиология»

Документ о квалификации: удостоверение о повышении квалификации
установленного образца

Объем: 36 часов

Составители: Скрипникова Елена Владимировна, к.с.-х.н., доцент, директор Института естествознания; Емельянов Алексей Валерьевич, д.б.н., профессор, проректор по инновационной деятельности.

Рецензент: Гусев А.А., д.б.н., профессор, директор НИИ экологии и биотехнологии

Дополнительная профессиональная программа утверждена на заседании Ученого совета Института естествознания 24 октября 2020 г., протокол № 2.

НАИМЕНОВАНИЕ ПРОГРАММЫ: «САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

I. Характеристика программы:

1.1. Нормативные правовые основания разработки программы

Нормативную правовую основу разработки программы составляют:
Федеральный закон от 29 декабря 2012 г. № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» (ФЗ 273);

Приказ Минобрнауки России от 1 июля 2013 г. № 499 «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по дополнительным профессиональным программам» (зарегистрирован Минюстом России 20 августа 2013г., регистрационный № 29444);

Постановление Правительства Российской Федерации от 22 января 2013 г. № 23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов»;

Приказ Минтруда России от 12 апреля 2013 г. № 148н «Об утверждении уровней квалификаций в целях разработки проектов профессиональных стандартов»;

Приказ Минобрнауки России от 29 марта 2019 г. № 178.

Программа повышения квалификации разработана с учетом требований следующих профессиональных стандартов:

15.010 Профессиональный стандарт «Микробиолог», утвержденный приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 31 октября 2014 г. № 865н (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 24 ноября 2014 г., регистрационный № 34868)

Обобщенные трудовые функции (код, уровень квалификации, наименование)	Трудовые функции (код, уровень квалификации, наименование)	Трудовые действия	Знания и умения
А6 Техническое	А/01.6 Подготовка лабораторной	• Обеззараживание лабораторной посуды и инструментов	Знания: Требования к санитарно-гигиеническому состоянию

обеспечение микробиологических работ	посуды и инструментов	<ul style="list-style-type: none"> • Мытье лабораторной посуды и инструментов с соблюдением необходимых требований • Подготовка лабораторной посуды и инструментов к стерилизации 	<p>помещений и оборудования микробиологических лабораторий</p> <p>Требования к технике проведения работ в микробиологической лаборатории</p> <p>Требования к порядку использования средств индивидуальной защиты</p> <p>Средства и методы дезинфекции, используемые при работе с микроорганизмами</p> <p>Умения:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Готовить дезинфицирующие средства • Дезинфицировать лабораторную посуду и инструменты • Использовать средства индивидуальной защиты при работе с микроорганизмами
	А/02.6 Обеспечение санитарно-гигиенических требований при выполнении микробиологических работ	<ul style="list-style-type: none"> • Подготовка стерилизационного оборудования • Стерилизация лабораторной посуды и инструментов, в том числе автоклавирование • Контроль работы бактерицидных установок, холодильников и термостатов • Дезинфицирование и содержание в чистоте лабораторных помещений • Ведение журнала учета выполнения микробиологических исследований в соответствии с установленными 	<p>Знания</p> <ul style="list-style-type: none"> • Особенности работы паровых и воздушных стерилизаторов и способы стерилизации • Способы контроля работы оборудования в микробиологической лаборатории • Техника работы с бактерицидными лампами, используемыми для обеззараживания воздуха, поверхностей в помещениях микробиологических лабораторий <p>Умения</p> <ul style="list-style-type: none"> • Работать с автоклавом • Контролировать работу лабораторного оборудования • Дезинфицировать мебель, приборы, аппараты, стены микробиологических лабораторий

	<p>формами</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Вести журналы учета выполнения микробиологических исследований в соответствии с установленными формами
<p>А/03.6 Приготовление реактивов и питательных сред для выращивания микроорганизмов</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Подготовка дистиллированной воды для питательных сред • Подготовка реактивов для микробиологических работ • Составление питательных сред по рецептуре • Варка питательных сред до состояния готовности • Разлив питательных сред для последующего автоклавирования • Обеспечение условий хранения питательных сред 	<p>Знания</p> <ul style="list-style-type: none"> • Требования безопасности при работе с химическими реактивами • Состав и концентрация основных реактивов для микробиологических работ • Рецептуры основных питательных сред и методы их приготовления • Требования к стерилизации питательных сред <p>Умения</p> <ul style="list-style-type: none"> • Пользоваться дистиллятором • Работать с опасными химическими растворами • Пользоваться справочными сборниками, нормативными документами с целью приготовления питательных сред, реактивов, растворов • Применять методы стерилизации питательных сред • Использовать оборудование для хранения готовых

			питательных сред
--	--	--	------------------

1.2. Категория слушателей (обучающихся)

Специалисты, работающие в клинико-диагностических лабораториях, в сфере фармацевтики, АПК, экологии и охраны природы, пищевой и перерабатывающей промышленности, студенты, обучающиеся по естественнонаучным направлениям подготовки.

1.3. Требования к слушателям

Слушатели, имеющие высшее или средне-специальное образование.

1.4. Формы освоения программы: очная или очно-заочная. При реализации программы возможно применять электронное обучение и дистанционные образовательные технологии.

1.5. Цель и планируемые результаты обучения

Основной целью программы является формирование у слушателей компетенций, необходимых для профессиональной деятельности в сфере санитарной микробиологии.

В результате освоения программы повышения квалификации слушатель должен приобрести следующие знания, умения, необходимые для качественного изменения или формирования следующих компетенций.

Совершенствуемые и/или осваиваемые компетенции	Должен знать	Должен уметь	Формы контроля
Готовность использовать знания и современные методы исследований в сфере микробиологии	– научные основы микробиологии;	– ориентироваться в современных направлениях и методах микробиологии; – применять полученные знания для исследования санитарно-микробиологического состояния сред.	Зачет

1.6. Трудоемкость программы: 72 часа.

II. Учебный план

№№ п/п	Наименование разделов	Всего часов	В том числе			Форма контроля
			лекции	практич. , лаборат., семинар. занятия	сам. работа.	
1.	Отдельные теоретические и прикладные аспекты современной микробиологии	36	8	10	18	Зачет
2.	Основы санитарной микробиологии	36	8	10	18	Зачет
Итого:		72	16	20	36	

III. Содержание программы

ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА ПОВЕДЕНИЯ И РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

Микроорганизмы, их жизнедеятельность, технологические процессы с их участием изучают в специализированных микробиологических лабораториях.

Что же в общем виде представляет собой специализированная микробиологическая лаборатория?

Круг вопросов, которыми занимаются лаборатории, определяется их назначением. Самыми важными задачами клинико-диагностических лабораторий являются: микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний людей или животных, научная разработка новых методов лабораторной диагностики и эффективных мер борьбы с ними, подбор и проверка наиболее эффективных специфических (вакцины, сыворотки) и химических лечебно-профилактических препаратов при отдельных инфекционных заболеваниях.

По степени опасности (патогенности) все микроорганизмы разделены на 4 группы. Наиболее опасные отнесены к I и II группам. Работа с этими возбудителями проводится в специальных режимных лабораториях. Классификация, используемая ВОЗ, отличается от российской обратным порядком.

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля обеспечивается необходимым для работы количеством помещений, что регламентируется санитарно-эпидемиологическими правилами: «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (СП 1.3.2322-08).

Лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы занимаются контролем выпускаемой продукции на бактериальную загрязненность, разработкой мер обеззараживания пищевых продуктов, воды и кормовых средств от болезнетворных микробов: изучением и подбором наиболее эффективных штаммов микроорганизмов, используемых в соответствующей отрасли микробиологической промышленности.

Микробиологические лаборатории при сельскохозяйственных институтах и станциях занимаются изучением роли отдельных видов микроорганизмов в биохимических превращениях веществ в природе, в создании структуры и плодородия почвы, в почвенном питании растений. Многие из этих лабораторий изучают возбудителей инфекционных заболеваний растений, разрабатывают методы их лабораторной диагностики и меры борьбы с ними.

В связи с большой спецификой исследований, проводимых различными по профилю микробиологическими лабораториями, их оборудование и режим работы различны. Однако общность методов,

используемых для изучения микроорганизмов, предъявляет некоторые общие требования к организации микробиологических лабораторий и правилам работы в них.

Для правильного функционирования всех микробиологических лабораторий исключительно важное значение имеет размещение и состав производственных помещений. Специфика микробиологических работ требует, чтобы помещение, отведенное под производственную лабораторию, было изолировано от других производственных и жилых объектов или, в крайнем случае, размещалось в отдельной секции здания с изолированным входом.

В состав учебной микробиологической лаборатории должны входить:

- 1) лабораторная комната для проведения микробиологических исследований с непатогенными микроорганизмами;
- 2) моечная, оборудованная для мытья посуды;
- 3) препараторская, приспособленная для подготовки лабораторной посуды и хранения питательных сред;
- 4) материальная комната для хранения запаса реактивов, посуды, аппаратуры и хозяйственного инвентаря.

При организации микробиологической лаборатории следует учитывать, что большинство микробиологических исследований требует условий, обеспечивающих стерильность работы и исключающих возможность загрязнения внешней среды и работающих патогенными микробами. Поэтому в комнате, предназначенной для микробиологических исследований, необходимо иметь застекленный бокс с предбоксником. Площадь бокса определяется объемом работ лаборатории и обычно не превышает 5–7 м². Для стерилизации в боксе устанавливают бактерицидные лампы (БУФ-15; БУФ-30 и т.п.).

Микробиологическая лаборатория должна быть оснащена необходимой мебелью: лабораторными столами, стульями или винтовыми табуретками, шкафами или закрывающимися полками для хранения посуды, питательных сред, реактивов и аппаратуры.

Основное оборудование лаборатории:

- микроскопы,
- термостаты для выращивания микробов,
- аппаратура для стерилизации (автоклав, сухожаровый шкаф),
- ламинар-боксы,
- шейкеры-инкубаторы, ферментеры (при необходимости),
- центрифуги,
- аппарат для дистилляции воды,
- аналитические весы,
- рН-метры,
- холодильники для хранения музейных культур микроорганизмов и скоропортящихся препаратов и др.

Кроме этого, в лаборатории необходимо иметь достаточное количество стеклопосуды и инструментов, используемых при микробиологических

исследованиях (чашки Петри, пробирки, стекла предметные и покровные, пипетки пастеровские и градуированные, шпатели – стеклянные, цилиндры, матрасы, колбы, ступки фарфоровые, петли бактериологические, пинцеты, ножницы, скальпели, лотки эмалированные и др.).

В микробиологической лаборатории должны быть в достаточном количестве сухие питательные среды различного назначения, набор химических компонентов, наиболее часто используемых для приготовления питательных сред, набор углеводов, красителей и дезинфицирующих средств, фильтровальная бумага, иммерсионное масло, спирт, эфир и другие реактивы и материалы.

Правила работы в микробиологической лаборатории

В производственных лабораториях и учебных микробиологических лабораториях, где проводятся практические занятия, студенты постоянно должны помнить, что они имеют дело с микроорганизмами, которые далеко не всегда могут быть безвредными для окружающей среды и здоровья человека. При неосторожном обращении с материалом, содержащим болезнетворные микробы, можно не только заразиться, но и стать источником распространения инфекции. Поэтому при работе в микробиологической лаборатории или на практических занятиях по микробиологии необходимо всегда соблюдать следующие правила личной и общественной безопасности.

Перед началом работы каждый студент должен ознакомиться с техникой безопасности в микробиологической лаборатории и поставить свою подпись в журнале по технике безопасности. Работа осуществляется в халатах, головных уборах, перчатках. Перед началом работы необходимо проверить рабочее место, комплектность оборудования и его исправность, наличие этикеток на флаконах с жидкостями (о недостатках, обнаруженных на рабочем месте, сообщить преподавателю).

Во время работы необходимо соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя, соблюдая следующие правила.

- Все пробирки и чашки с посевами обязательно этикетировать: на этикетках должно быть указано название культуры, дата ее постановки, Ф.И.О. студента, поставившего культуру.

- Все поверхности, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микробов, сразу же дезинфицируют.

- Не допускается оставлять открытыми чашки, пробирки и колбы с культурами.

- Перед тем как открыть пробирку, колбу, чашку с культурой, фламбируйте в пламени спиртовки пробирку (край чашки, колбы).

- Прежде чем зажечь спиртовку, подтяните фитиль и выпустите скопившиеся пары спирта. При гашении спиртовки не дуйте на пламя, а накройте его колпачком. Категорически запрещается зажигать спиртовку от пламени другой спиртовки. В случае взрыва паров спирта в спиртовке

и выброса фитиля спиртовку (если она опрокинута) накройте колпачком, пламя погасите специальной салфеткой или краем клеенки, покрывающей стол.

- Все металлические предметы, используемые во время работы (микробиологическая петля, скальпель, пинцет и др.) после каждого соприкосновения с культурами прожигают в пламени спиртовки. Запрещается в процессе работы класть в карман халата или на стол пробирки с культурами, их нужно ставить в штатив.

- При расплавлении агаризованных питательных сред рекомендуется использовать водяную баню. Кипячение растворов на электроплитке производите на асбестовых прокладках в термостойких колбах. Нагревание жидкостей в пробирках на спиртовке производится с помощью держателя. Держать пробирку необходимо под углом 45° горлышком в сторону от себя.

- При работе с электроприборами нельзя отключать прибор мокрыми руками. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю.

- Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и т. п. помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью. Пинцеты, бактериологические петли и некоторые другие металлические предметы прожигают в пламени газовой горелки или спиртовки.

- После окончания работы необходимо поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры микробов и остатки исследуемого материала сдать преподавателю или лаборанту, а рабочее место привести в порядок и продезинфицировать.

В лаборатории запрещается:

- принимать пищу, курить, хранить продукты питания;
- протирать сырой тряпкой включенные приборы;
- работать с потрескавшейся стеклянной посудой;
- в учебных лабораториях не разрешается работать с живыми патогенными для человека микроорганизмами;
- брать руками ядовитые вещества (только в перчатках);
- пробовать на вкус и нюхать незнакомые вещества;
- работать с неисправными электроприборами;
- оставлять на рабочем месте ядовитые растворы (их сливают в специальный нейтрализующий сосуд).

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Микроскопия

Устройство микроскопа.

Микроскоп – это оптический прибор с линзами для получения увеличенных изображений объектов, невидимых невооруженным глазом. Микроскоп имеет как минимум двухступенчатое увеличение. Одна система линз, называемая объективом, подводится близко к образцу; она создает увеличенное и разрешенное изображение объекта. Изображение далее увеличивается другой системой линз, называемой окуляром. Окуляр имеет постоянное увеличение, его положение в микроскопе определено и закреплено стандартом (высота окуляра). Эти две системы линз расположены на противоположных концах тубуса.

Микроскоп даёт возможность различать структуры с расстоянием между элементами до 0,20 мкм.

Любой оптический микроскоп имеет базовые узлы, функциональное назначение которых не меняется от типа прибора. Микроскоп объединяет в себе три функциональные части: воспроизводящую, визуализирующую и осветительную.

Функция воспроизводящей системы – воспроизвести изображение объекта таким образом, чтобы оно как можно точнее передавало детали объекта с соответствующим разрешением, увеличением, контрастом и цветопередачей.

Основная часть воспроизводящей системы – *объектив*. Он состоит из сложной центрированной системы линз, дающей возможность получить правильное, увеличенное обратное изображение предмета.

Передняя линза объектива (сферическая или полусферическая), производящая увеличение изображения, называется фронтальной. Лежащие за ней линзы – коррекционные – исправляют изображение, устраняя недостатки – аберрации, создаваемые фронтальной линзой.

Фокусное расстояние линзы для лучей разной длины волны различно. Поэтому при использовании немонахроматического света формируемое линзой изображение предмета имеет окрашенные края. Подобный феномен известен как хроматическая аберрация; ее устраняют *ахроматические и апохроматические объективы* и их разновидности. При использовании апохроматических объективов почти полностью отсутствует хроматическая аберрация, т.е. разложение белого цвета на составные части спектра. Следовательно, создаются условия для наиболее правильной передачи окраски объекта.

Более распространенными являются ахроматы, в которых хроматическая аберрация устранена частично. Эти объективы содержат до шести

линз и дают изображение, наиболее резкое в центре. При микроскопировании цветных объектов с помощью ахроматов вокруг изображения может получиться желтоватый или зеленоватый фон.

Собственное увеличение объективов указано на оправе (8, 10, 20, 40, 60, 90, 100). Числовая апертура маркируется на корпусе объектива после увеличения.

Числовая апертура («охват» линзы) – произведение показателя преломления среды, отделяющей объект от передней линзы объектива микроскопа, на синус апертурного угла.

Также на объективе маркируется рабочее расстояние.

По способу использования объективы бывают сухими и иммерсионными, т.е. погружёнными. Сухими объективами называют такие, у которых между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. Эти объективы характеризуются менее сильным увеличением и относительно большим фокусным расстоянием.

При микроскопировании с сильными объективами, фокусное расстояние которых незначительно, необходимо создать однородную оптическую среду между фронтальной линзой объектива и стеклом препарата. Это достигается путем погружения линзы в каплю кедрового масла (масляная иммерсия – МИ) или воды (водная иммерсия – ВИ) на препарате. За счет этого повышается разрешающая способность микроскопа, повышается видимость и увеличивается глубина просматриваемого слоя.

Функция визуализирующей системы – передать изображение объекта, созданное воспроизводящей системой микроскопа таким образом, чтобы оно с небольшим дополнительным увеличением (или без него) было видно достаточно резко на сетчатке глаза или мониторе.

С помощью оптического носителя передача изображения осуществляется через *окуляр*. Окуляры увеличивают изображение без дополнительного разрешения. На окуляре указывается его линейное увеличение.

С помощью электронного носителя передача изображения осуществляется через цифровую или аналоговую систему.

Модулем, с помощью которого происходит визуализация, является визуальная насадка. В зависимости от количества выходов они подразделяются на монокулярные, бинокулярные и бинокулярные с фото- и видеовыходом (тринокулярные).

Функция осветительной системы микроскопа – создать световой поток, позволяющий осветить объект таким образом, чтобы воспроизводящая система предельно точно могла выполнить свою основную функцию.

Осветительная система микроскопа проходящего света включает следующие элементы: *источник света* – галогенную лампу, *коллектор* – оптический элемент, создающий световой поток, «заполняющий» осветительную апертуру конденсора или выходной зрачок объектива; *конденсор* – оптическая система, предназначенная для увеличения количества света, поступающего в микроскоп. В микроскопах проходящего света конденсор

расположен между объектом (предметным столиком) и источником света. При помощи конденсора осуществляется настройка освещения в соответствии с принципами Келера. Световой поток, создаваемый конденсором, обеспечивает как равномерное освещение поля на предмете, так и световой конус, называемый осветительной числовой апертурой, равной числовой апертуре объектива.

Нормальную работу микроскопа обеспечивает единая технология расчета, конструирования и сборки оптико-механической конструкции.

Все механические части микроскопа должны обеспечивать точность перемещения и позиционирования подвижных узлов, а также точность центрировки и установки расстояний между оптическими элементами микроскопа.

Механическая система включает:

- 1) основание со встроенным осветителем;
- 2) тубусодержатель, на котором устанавливаются:
 - узел крепления визуальной насадки с механизмом раздвижки вместе с окулярами;
 - револьверное устройство крепления объективов вместе с объективами;
 - фокусирующий механизм, включающий грубую и точную настройку на резкое изображение;
 - узел крепления предметного стола вместе с предметным столиком;
 - узел крепления и перемещения конденсора вместе с конденсором.

Методы исследования и контрастирования.

Основным методом наблюдения для всех типов микроскопов является *метод светлого поля*: в поле зрения на светлом поле наблюдается контрастное однотонное или естественное цветное изображение объекта.

Обнаруженный в светлом поле объект может в дальнейшем маркироваться, а затем демонстрироваться с помощью другого метода контрастирования.

Все методы контрастирования настраиваются только после того, как микроскоп изначально будет настроен по принципу Келера. Принцип Келера заключается в том, что осветительная система микроскопа (источник света, коллектор, конденсор) устанавливается на одну оптическую ось с собственно оптикой микроскопа (объективом, окуляром). Для этого есть две диафрагмы: полевая (установлена вблизи осветителя) и апертурная (смонтирована внутри конденсора).

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. Ни один прямой луч не попадает в объектив. Видимое поле в микроскопе будет темным, а на темном фоне в отраженном свете присутствует яркое блестящее свечение контура вокруг объекта. Метод применяется для наблюдения за живыми микроорганизмами.

Эффект темного поля создается за счет перекрытия осветительной апертуры конденсора и выходного зрачка объектива или при помощи специального конденсора.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые и неокрашенные объекты за счет повышения их контрастности. В отличие от метода темного поля, выявляющего лишь контуры объекта, метод фазового контраста позволяет увидеть элементы внутренней структуры рассматриваемого прозрачного объекта.

Для работы по методу фазового контраста нужно использовать обычный микроскоп, специальный фазово-контрастный конденсор, а вместо окуляра – вспомогательный микроскоп малого увеличения.

Последовательность работы с фазово-контрастным конденсором следующая.

1. Заменяют конденсор микроскопа фазово-контрастным конденсором так, чтобы при подъеме фронтальная линза находилась на уровне предметного столика. Револьвером включают кольцевую диафрагму «О».

2. Обычные объективы заменяют фазовыми.

3. Помещают препарат, приготовленный по типу «раздавленная капля», на предметный столик микроскопа.

4. Макрометрическим винтом добиваются точной фокусировки на плос-кость исследуемого препарата.

5. Устанавливают освещение по Келеру, после чего изменение положения конденсора не допускается.

6. Вместо окуляра вставляют вспомогательный микроскоп. Перемещая окуляр вспомогательного микроскопа внутри тубуса, получают четкое изображение фазового кольца. В этом положении окуляр фиксируется винтом.

7. Вращая револьвер конденсора, включают нужную кольцевую диафрагму, в результате чего в окуляре помимо фазового темно-серого кольца объектива появится изображение светлого кольца диафрагмы конденсора.

8. Вращая центрировочные винты, совмещают светлое кольцо конденсора с темным кольцом объектива.

9. Вспомогательный микроскоп заменяют окуляром.

10. При исследовании объекта используют желто-зеленый светофильтр.

При правильной установке освещения изображение объектов в препарате должно получиться контрастным. При смене объективов или препарата необходимо проверить совмещенность кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива.

Помимо описанных методов в некоторых микроскопах используются методы варел-контраста, дифференциально-интерференционного контраста (ДИК), поляризованный свет и другие методы.

Люминесцентная микроскопия

Некоторые вещества и организмы способны светиться под влиянием падающего на них света. Это люминесценция (или флюоресценция).

Люминесцентная микроскопия применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов.

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценцию. При первичной флюоресценции исследуемый объект содер-

жит вещества, способные флюоресцировать при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Большая часть объектов не обладает собственной флюоресценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии их обрабатывают красителями (флюорохромами), способными флюоресцировать.

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют в ацетоне или этаноле 5–10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15–20 мин, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Конструкция люминесцентного микроскопа отличается от микроскопа проходящего света наличием осветителя отраженного света, расположенного над объективами, и дополнительных узлов, в том числе специальных блоков со светофильтрами и светоделительной прозрачной пластинкой, которые расположены между осветителем отраженного света и объективами.

Преимущества люминесцентной микроскопии:

- цветное свечение;
- высокая степень контрастности светящихся объектов;
- возможность исследовать прозрачные и непрозрачные объекты, наблюдать за их жизненными процессами;
- устанавливать локализацию отдельных микробов.

Электронная микроскопия.

Возможности оптических микроскопов ограничиваются не числом линз, а слишком большой длиной волны видимого света (600 нм). Объекты, диаметр которых меньше этой величины, или линии, разделенные расстоянием менее 200 нм, находятся за пределами разрешающей способности микроскопа. Применение вместо световых волн потока движущихся электронов позволило создать электронный микроскоп.

Различают два типа электронных микроскопов: трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп и сканирующий (растровый) электронный микроскоп.

Трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп дает двумерное (плоское) изображение. При сканирующей (растровой) электронной микроскопии пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое посредством катодно-лучевой трубки формирует трехмерное изображение на светящемся экране; этот процесс сходен с формированием телевизионного изображения. Разрешающая способность сканирующего микроскопа достигает 3 нм, увеличение – 300000. Кроме того, существуют комбинированные электронные микроскопы, которые могут работать в просвечивающем, сканирующем, либо в двух режимах одновременно. Электронная микроскопия позволяет изучить структуру микроорганизмов на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Приготовление микроскопических препаратов

Основное требование при работе с микроорганизмами – соблюдение асептики, т. е. таких условий, при которых в пробирку с изучаемой

культурой не смогли бы попасть другие микроорганизмы (например, из воздуха, с предметов, используемых в процессе выполнения работы). Кроме того, нужно иметь в виду, что среди микроорганизмов многие условно патогенны, что требует повышенного внимания и аккуратности в работе.

Морфологическая характеристика микроорганизмов включает форму клеток, их сочетание и размеры, подвижность, способность к образованию спор и капсул, а также наличие в клетках некоторых включений. Изучение морфологических особенностей проводят, используя методы микроскопии и различные способы окраски клеток. При описании морфологии клеток следует указывать возраст культуры, состав среды и условия культивирования.

Выращивают микроорганизмы в стеклянной или пластиковой посуде: пробирках, колбах или чашках Петри. В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Пробирки со средами и культурами при работе следует устанавливать на штативах.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели. Бактериологические петли изготавливают из проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм.

Бактериологическая петля прокаливается, пробки и край пробирки фламбируются. Если в работе используются суспензии микроорганизмов или культуры, выращенные на жидких средах, они берутся предварительно простерилизованной пипеткой, у которой широкий конец закрыт ватой. Такие пипетки стерилизуются и хранятся завернутыми в бумагу (каждая отдельно).

Для наблюдения микроорганизмов под микроскопом необходимо соответствующим образом приготовить препарат. Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах. Предметные стекла должны иметь толщину, не превышающую 1,2–1,4 мм. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в выпуклые, медленно высыхающие капли. Наиболее надежный способ обезжиривания – обработка стекол хромовой смесью с последующим споласкиванием водой и спиртом. Хорошие результаты для обезжиривания дает протирание вымытых и высушенных стекол чистой ваткой, смоченной эфиром (после этого промывание водой уже не требуется), или, наконец, обжигание поверхности стекла в пламени горелки (жир при этом сгорает). Хранить чистые обезжиренные стекла можно в сухом состоянии или в спирте.

Покровные стекла, применяемые обычно для приготовления препаратов живых бактерий и наблюдений с сухими системами, также должны быть тщательно вымыты и высушены. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15–0,17 мм. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

Наблюдать микроорганизмы в живом состоянии можно на препаратах: «раздавленная капля», «висячая капля», «отпечаток».

Препарат «раздавленная капля».

На предметное стекло наносят маленькую каплю воды и переносят в нее небольшое количество культуры изучаемых микроорганизмов, размешивают и покрывают покровным стеклом. Если культура микроорганизмов находится в пробирке, предварительно края пробирки необходимо обжечь в пламени спиртовки. Если исследуемые микроорганизмы растут на плотной питательной среде, то микробную массу переносят в приготовленную каплю воды с помощью бактериологической петли. Если же исследуется культура, выращенная в жидкой среде, то на предметное стекло суспензию клеток наносят с помощью стерильной пипетки. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно не наносить. Капля с исследуемым материалом должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под покровного стекла. Если имеется избыток жидкости, то его следует удалить фильтровальной бумагой. Приготовленный таким образом препарат помещают на предметный столик микроскопа и рассматривают его с сухой системой.

Препарат «раздавленная капля» позволяет установить форму клеток изучаемых микроорганизмов, их размеры, расположение, способ спорообразования, а также наличие или отсутствие подвижности.

Препарат «висячая капля».

Препарат «висячая капля» используют для выявления подвижности у микроорганизмов. Кроме того, в препарате «висячая капля» можно наблюдать за размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор, отношением клеток к химическим раздражителям. Для приготовления препарата небольшую каплю суспензии микроорганизмов наносят на покровное стекло, затем его покрывают предметным стеклом с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло с прилипшим к нему покровным стеклом переворачивают. Капля оказывается висячей в герметически закрытой влажной камере, из которой жидкость испаряется очень медленно, и поэтому препарат долгое время остается пригодным для наблюдения. Для длительных наблюдений целесообразно пользоваться стерильным стеклом, а суспензию бактерий готовить не в воде, а в жидкой питательной среде.

Препарат «отпечаток».

Из агаризованной среды в чашке Петри, на которой изучаемые микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик (блок) и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом, и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды (можно в каплю метиленового синего) на предметное стекло

и рассматривают под микроскопом с сухой системой. Такой отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии предметным стеклом. Отпечатки можно фиксировать и окрашивать любым способом. Эти препараты удобны для изучения естественного расположения клеток в колонии микроорганизмов, и особенно для исследования формы спор и спораносцев у актиномицетов и грибов.

Фиксированные окрашенные препараты.

Для выявления некоторых морфологических особенностей и количественного учета микроорганизмов, проверки чистоты культуры и для ряда других целей готовят фиксированные окрашенные препараты, которые могут храниться длительное время. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На обезжиренное предметное стекло наносят маленькую каплю воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала, как для препарата «раздавленная капля». Получившуюся суспензию равномерно размазывают петлей или краем покровного стекла на площади 1–2 см² возможно более тонким слоем.

Высушивание мазка. Лучше всего сушить препарат при комнатной температуре на воздухе. Если высушивание мазка замедленно, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Перегреть мазок нельзя.

Фиксация препарата убивает микроорганизмы, обеспечивает лучшее прилипание клеток к стеклу, делает мазок более восприимчивым к окраске (мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые). Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегреть мазок, так как при этом могут произойти грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами. В этом случае фиксирующую жидкость либо наливают на мазок, либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксатором. Чаще всего пользуются этиловым спиртом (время фиксации 15–20 мин), смесью равных объемов этилового спирта и эфира (препарат погружают на 15–20 мин в смесь или заливают ею мазок и дают смеси испариться). По окончании фиксации препарат отмывают от фиксатора, осторожно обливая его водопроводной водой, и окрашивают.

Для микроскопического исследования приготовленные мазки, высушенные и зафиксированные, подвергают окраске. Окраска бывает простая и сложная. Простая окраска заключается в нанесении на мазок какой-либо одной краски на определенное время. Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются анилиновыми красителями: фуксином, генцианвиолетом, метиленовым синим.

Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие на стенках кюветы, и обливают из пипетки раствором

выбранного красителя. Конец пипетки не должен касаться мазка. Обычно бывает достаточно покрыть мазок несколькими каплями красителя. Сроки окрашивания указанными красителями колеблются от 1 до 3 мин. При окраске мазков концентрированными растворами красителей (карболовый фуксин Циля, карболовый генциановый или кристаллический фиолетовый) окрашивание производят через фильтровальную бумагу, задерживающую частицы красителя: на фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор красителя.

По окончании окраски препарат промывают струей воды до тех пор, пока стекающая вода станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают его фильтровальной бумагой и рассматривают с иммерсией.

Метод окрашивания препаратов в модификации Синева позволяет использовать вместо растворов красителей фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем. На фиксированный мазок наносят несколько капель дистиллированной воды, накладывают полоску сухой фильтровальной бумаги, пропитанной красителем, и прижимают ее пинцетом к поверхности стекла. По истечении времени окрашивания фильтровальную бумагу снимают и препарат промывают водой. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается совершенно светлым и чистым,

а окрашенными оказываются только клетки микроорганизма.

Описанный метод относится к так называемым *позитивным* способам окраски, когда окрашиваются клетки микроорганизмов. Помимо этого существует *негативное контрастирование*, когда краситель заполняет пространство, окружающее клетки, в результате чего микроорганизмы, в которые краситель не проникает, выглядят как светлые частицы на равномерно окрашенном фоне. Для негативного окрашивания чаще всего пользуются жидкой тушью. Применяют также водные растворы конгорот (3%) и некоторых других красителей. Окрашивание негативными красителями можно вести двумя путями: либо раствор красителя наносят на сухой фиксированный мазок, дают ему высохнуть и сухой препарат рассматривают с иммерсией, либо каплю исследуемой суспензии бактерий смешивают с красителем непосредственно на предметном стекле, покрывают ее покровным стеклом и изучают с сухой системой. В последнем случае негативное окрашивание можно комбинировать с прижизненной окраской клеток. Для этого каплю исследуемой суспензии микроорганизмов помещают вначале в каплю разбавленного раствора фуксина, а затем смешивают с каплей туши и закрывают покровным стеклом.

Препараты, работа с которыми закончена (предметные и покровные стекла), прежде, чем вымыть, помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Определение размеров клеток проводят под микроскопом с помощью окулярной линейки (микрометра) или окулярного винтового микрометра. Размеры клеток выражают в микронах.

Практическая работа

1. Установить правильное освещение микроскопа.
2. Просмотреть готовые окрашенные мазки с помощью сухого и иммерсионного объективов.
3. Рассмотреть культуру сенной палочки на препаратах: висючая капля, раздавленная капля, фиксированный мазок. Отметить, чем отличается элективная культура от смешанной. Мазки окрасить метиленовым синим и фуксином.
4. На постоянных препаратах измерить размеры клеток сенной палочки и микроорганизма, полученного от преподавателя.
5. Сделать зарисовки.

Оборудование: весы, стерильные пипетки, стерильная вода в пробирках, предметные и покровные стекла, микроскопы, красители, культура сенной палочки, окуляр-микрометр, объектив-микрометр, дезинфицирующий раствор.

Контрольные вопросы

1. Какие типы микроскопов используют в микробиологических исследованиях?
2. Из каких частей состоит микроскоп и каково их назначение?
3. Как проводится настройка освещения по Келеру?
4. Для чего используется иммерсионная микроскопия?
5. Какая посуда используется для выращивания микроорганизмов?
6. Какие свойства микроорганизмов исследуются на прижизненных и постоянных препаратах?
7. Как приготовить препарат «раздавленная капля»?
8. Какими методами проводится фиксация микроорганизмов на предметном стекле?
9. Какие красители используют для окраски микроорганизмов? Для каких целей используют сложные методы окраски?

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ. ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Строение клеточной стенки. Внутрицитоплазматические включения

Микробная клетка – сложная живая система, характеризующаяся высокой степенью упорядоченности составляющих ее структур; каждая структура имеет определенную жизненную функцию, а взаимодействие их между собой обеспечивает существование клетки, ее целостность.

Для изучения внутреннего строения клеток применяют специальные методы окраски – цитохимические методы исследования. Многие из этих методов преследуют диагностические цели. По форме клетки микроорганизмов не слишком разнообразны, и в ряде случаев, чтобы установить принадлежность микроба к тому или иному роду и виду, необходимо провести специальное окрашивание клетки или вещества, накапливающегося в ней.

Клеточная стенка является обязательным структурным элементом бактериальной клетки, исключение составляют микоплазмы и L-формы бактерий. Она очень эластична и упруга, создает скелет бактериальной клетки, выдерживает очень высокое внутриклеточное давление. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50% сухой массы клетки. Толщина данной структуры составляет 10–80 нм. Без специальных методов окраски рассмотреть клеточную стенку бактерий под световым микроскопом не удастся. У крупных форм микроорганизмов, например из рода *Bacillus*, ее можно наблюдать в результате явления плазмолиза, вызванного помещением культуры в гипертонический раствор сахарозы, мочевины, поваренной соли.

По химическому составу клеточная стенка прокариот коренным образом отличается от оболочки клеток эукариот. Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *муреин*, относящийся к классу пептидогликанов. По содержанию муреина и специфике дополнительных компонентов, включенных в муреиновую сеть, все бактерии подразделяются на две группы: *грамположительные* и *грамотрицательные*. В 1884 г. Х. Грам предложил метод окраски бактерий, вошедший в практику микробиологии как один из диагностических признаков.

Метод основан на различной способности микробов удерживать красители трифенилметанового ряда – кристаллвиолет и генцианвиолет в клетке. Способность микроорганизмов окрашиваться по методу Грама или утрачивать окраску объясняется спецификой химического состава и ультраструктуры их клеточной стенки.

Клеточная стенка грамположительных бактерий достаточно массивна, толщина ее достигает 20–80 нм. Она имеет гомогенную губчатую структуру, пронизанную порами, и плотно прилегает к цитоплазматической мембране.

Пептидогликан (муреин) в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет от 50 до 90% ее сухой массы. С муреином связаны тейхоевые кислоты, которые представляют собой полимеры глицерина или рибита, остатки которых соединены фосфодиэфирными связями. Глицеринтейхоевые кислоты нередко связаны с липидом, находящимся в цитоплазматической мембране. Помимо вышеназванных компонентов, в составе клеточной стенки грамположительных бактерий в небольшом количестве обнаружены полисахариды, белки и липиды.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет 14–17 нм. По химическому составу она более разнообразна. Внутренний слой клеточной стенки представлен муреином, на долю которого приходится от 1 до 10% ее сухой массы. Внешний слой клеточной стенки – наружная мембрана, образована фосфолипидами, липополисахаридами, липопротеидами и белками (в том числе поринами). Основной фракцией наружной мембраны являются липиды, составляющие в среднем 22% сухой массы клеточной стенки. По строению наружная мембрана имеет типичную трехслойную организацию, характерную для элементарных мембран.

Структуры клеточной стенки грамотрицательных бактерий отграничены от цитоплазматической мембраны и разделены между собой электронно-прозрачным промежутком – периплазматическим пространством.

Клеточная стенка бактерий выполняет ряд функций. Она является наружным барьером клетки, устанавливающим контакт микроорганизма со средой. Обладая высокой степенью прочности, она выдерживает внутреннее давление протопласта в гипотоническом растворе.

Исключение составляют галофильные бактерии, клеточные стенки которых лишены муреина. Плотность (ригидность) муреинового каркаса клеточной стенки определяет форму микроба. Поскольку на поверхности клеточной стенки бактерий находятся фагоспецифичные рецепторы, следовательно, именно она определяет адсорбцию фага.

Структурную дифференциацию клеточной стенки грамотрицательных бактерий следует рассматривать как более высокую ступень эволюционного развития прокариот. Наружная мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий выполняет роль дополнительного барьера, определяющего транспорт веществ в клетку, и не случайно, что грамотрицательные бактерии оказываются более устойчивыми к действию различных химических веществ, ферментов и антибиотиков.

Действие некоторых антибиотиков (группы пенициллина и цикloserина), подавляющих синтез клеточной стенки бактерий, а также литических ферментов, разрушающих муреин, приводит к образованию протопластов или сферопластов. У последних, в отличие от протопластов, клеточная стенка разрушена не полностью.

Протопласты и сферопласты сохраняют обмен веществ, способность к росту, а иногда и к делению. При снятии действующего фактора они

превращаются (реверсируют) в нормальные клетки, либо трансформируются в так называемые L-формы, либо погибают.

L-формами бактерий принято называть бактерии, лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Морфологически L-формы бактерий полиморфны. Они представлены шаровидными или неправильной формы телами, часто вакуолизированными, размером от мельчайших (0,2–1 мкм в диаметре) до гигантских (от 5 до 50 мкм). Среди L-форм бактерий различают стабильные, которые почти никогда не реверсируют в исходный вид, и нестабильные, восстанавливающие клеточную стенку после прекращения действия трансформирующего агента.

Внутрицитоплазматические включения бактериальной клетки.

К *внутрицитоплазматическим включениям* бактериальной клетки относятся и запасные вещества – полифосфаты, полисахариды, поли-*p*-оксимасляная кислота и отложения серы. В условиях голодания запасные вещества являются источником энергии и питания бактерий. Запасные вещества накапливаются в цитоплазме при выращивании бактерий на обогащенных питательных средах, при заторможенных темпах роста культуры или при переходе ее в стадию покоя. В клетках бактерий может накапливаться одно запасное вещество или несколько разных по химической природе веществ. Характер запасных веществ определяется видом микроорганизма и условиями культуры.

Основным энергетическим запасом бактериальной клетки является *волютин*, представленный полифосфатами. Гранулы волютина оптически плотные, по размерам составляют 0,1–0,5 мкм. Волютин обладает свойством метакроматической окраски. При окраске мазка метиленовым синим и толуидиновым синим волютин просматривается в виде фиолетово-красных гранул. За свойство изменять цвет красителя Бабеш и Эрнст, впервые описавшие гранулы волютина, назвали их метакроматиновыми зернами. Обычно волютин накапливается в больших количествах и легко выявляется в клетках многих бактерий – спирилл, молочнокислых бактерий, азотобактера, возбудителя дифтерии при культивировании их на питательной среде, богатой углеводами или содержащей глицерин.

К *запасным компонентам* бактериальной клетки относятся полисахариды, гликоген и крахмалоподобное вещество – гранулеза. При голодании полисахариды служат источником углерода и энергетическим материалом.

Гликоген характерен для многих бактерий – сарцин, бацилл, сальмонелл, кишечной палочки и др. *Гранулеза* – специфическое крахмалоподобное вещество анаэробных спорообразующих бактерий рода *Clostridium*.

В клетках многих бактерий (*Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium* и др.) накапливается *поли-*p*-оксимасляная* кислота. Округлые, овальные гранулы поли-*p*-оксимасляной кислоты, окруженные белковой мембраной, резко преломляют свет и поэтому хорошо видны в световой микроскоп. Суданом III они окрашиваются в оранжево-красный цвет. Накопление поли-*p*-

оксимасляной кислоты в клетках бактерий наблюдается при выращивании их на среде с повышенной концентрацией источников углерода – глюкозы, глицерина, пирувата, ацетата и дефицитом азота. У некоторых бактерий содержание поли-*p*-оксимасляной кислоты может достигать 70–80% сухой массы клетки и в условиях голодания служить источником энергии.

Помимо вышерассмотренных основных запасных включений, в цитоплазме бактерий имеются специфические включения.

Цитохимические методы исследования микробной клетки

Окраска клеток микроорганизмов по Грамму

В 1884 г. Христиан Грам описал метод окраски анилин-генциановым фиолетовым и йодом. С тех пор было предложено большое число модификаций этого метода. Важное значение имеет применение этого метода в бактериологии, так как оно позволило подразделить все микроорганизмы на грамположительные и грамотрицательные.

Окрашивание бактерий по Граму связано со строением их клеточной стенки.

При обработке мазков микроорганизмов генцианвиолетом, а затем йодом препарат, окрашенный в черный цвет, обладает свойством обесцвечиваться под действием спирта. При этом одни бактерии также обесцвечиваются, а другие окрашиваются в фиолетовый цвет. При дополнительной окраске (в частности, разведенным фуксином 1:10) обесцвеченные спиртом бактерии окрашиваются в красный цвет (грамотрицательные). Другие же, прочно удерживающие фиолетовую окраску (соединение йод + генцианвиолет), т.е. не обесцвечивающиеся спиртом, относятся к группе грамположительных бактерий. Различие в окраске объясняется особенностями химического строения бактерий и ультраструктурой клеточных стенок, которые постоянны для определенного вида. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит многослойный муреин со сравнительно часто расположенными сшивками.

Белки грамположительных бактерий имеют более кислый характер и лучше окрашиваются основными красителями, чем у грамотрицательных бактерий. Кроме того, грамположительные бактерии содержат рибонуклеат магния, который взаимодействует с образующимся в процессе окраски комплексом и препятствует вымыванию его спиртом. На результат окрашивания оказывают влияние небольшие отклонения в условиях культивирования или в методе окраски, возраст культуры, кислотность среды (в кислой среде, как правило, все бактерии грамотрицательны).

Техника окраски по Граму. На хорошо обезжиренное предметное стекло наносят три тонких мазка разных культур микроорганизмов (два из них – контрольные с заведомо известным отношением к окраске по Граму). Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают

в течение 1 мин феноловым раствором генциана фиолетового (или кристал-

лического фиолетового), держа стекло в несколько наклонном положении. Сливают краситель и, не промывая препарат водой, наносят на него раствор Люголя на 1 мин (до полного почернения мазка). Стекло и в этом случае лучше держать в наклонном положении. Препарат, не промывая водой, обрабатывают, непрерывно покачивая, 96% спиртом в течение 15–20 с. Время обесцвечивания очень существенно, при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки, при недостаточном сроке обработки препарат окажется переокрашенным.

Промыв препарат водой, его окрашивают фуксином Пфейфера в течение 1 мин. После этой обработки грамположительные микроорганизмы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные имеют только цвет дополнительной окраски (фуксина).

Результаты окраски по Граму зависят от возраста культуры: в старых культурах мертвые клетки всегда окрашиваются грамотрицательно. Некоторые бактерии (коринебактерии, протей) окрашиваются грамвариабельно, т.е. часть клеток – как грамположительные, а часть – как грамотрицательные.

В качестве объектов для окраски клеток микроорганизмов по Граму рекомендуются дрожжи. *Bacillus mesentericus*, или *Bacillus subtilis* (грамположительные), и кишечная палочка – *Escherichia coli* (грамотрицательная).

Метод Грама в модификации Синева. На фиксированный мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги шириной 3 см, предварительно пропитанную 1% спиртовым раствором кристаллического фиолетового

и высушенную (в высушенном виде бумага может долго храниться). На бумагу наносят 2–3 капли воды и оставляют ее на препарате 2 мин. В дальнейшем окраску проводят по вышеописанной методике. Модификация Синева нашла широкое применение в практике.

Метод Грама в модификации Калины. На предметное стекло наносят небольшую каплю дистиллированной воды, помещают в нее минимальное количество клеток микроорганизмов и петлей добавляют 0,5% спиртовой раствор кристаллического фиолетового. Суспензию равномерно распределяют на площади 1 см², подсушивают и фиксируют однократным проведением над пламенем горелки. После этого препарат в течение 1 мин обрабатывают реактивом, содержащим 10 мл 5% раствора фуксина Пфейфера, 10 мл 10% раствора йода, 10 мл ацетона и 70 мл 0,5% раствора йодита калия. Затем препарат опускают на мгновение в 96% этиловый спирт и быстро высушивают фильтровальной бумагой.

Экспресс-метод Грезерсона. На предметном стекле в капле 3% раствора КОН готовится суспензия изучаемой культуры. При этом грамположительные бактерии коагулируют, а грамотрицательные образуют вязкую тянущуюся массу.

Выявление кислотоустойчивости у бактерий. Метод Циля – Нильсена.

Кислотоустойчивость – свойство, особенно характерное для микобактерий и некоторых актиномицетов. Оно связано с особенностями химиче-

ского состава клеточных стенок, главным образом с наличием в них миколовых кислот. Кислотоустойчивость проявляется в способности клеток трудно воспринимать красители, а при окрашивании – прочно их удерживать.

До фиксации мазка бактерий на пламени препарат готовят обычным способом. Далее на фиксированный в пламени и остывший препарат помещают полоску фильтровальной бумаги, обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля и нагревают препарат над пламенем 5 мин. Нельзя допускать высыхания препарата, в случае необходимости на него добавляют 1–2 капли воды. Нельзя также доводить краситель до кипения: как только появятся пары, препарат отводят в сторону. По окончании окрашивания и охлаждения препарата, бумагу удаляют, а мазок промывают слабой струей водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке. Затем препарат промокают фильтровальной бумагой и погружают на 3–5 с в 5% раствор H_2SO_4 или 3% раствор HCl . Снова промывают препарат водой, промокают и окрашивают в течение 3–5 мин метиленовым синим Леффлера. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некислоустойчивые – в синий.

Выявление спор в клетках бактерий.

Способ Ожешко. Для знакомства со спорами бактерий готовят препарат картофельной палочки *Bacillusmesentericus* и сенной палочки *Bacillus subtilis*. До фиксации мазка в пламени препарат готовят обычным способом. На остывший после фиксирования в пламени препарат наносят 5% раствор хромовой кислоты. Через 5–10 мин его смывают водой, накрывают препарат полоской фильтровальной бумаги, обильно смачивают бумагу карболовым фуксином Циля. Затем препарат подогревают над пламенем горелки до появления паров (но не до кипения), отводят его в сторону и добавляют новую порцию красителя. Так продолжают в течение 7 мин. Краситель должен испариться, а бумага подсохнуть. После охлаждения бумагу снимают, препарат промывают водой и промокают фильтровальной бумагой.

В результате такой обработки клетки со спорами равномерно прокрашиваются. Цитоплазму клеток обесцвечивают, обрабатывая ее 1% раствором соляной или серной кислоты в течение 16–18 с. Обесцвеченный препарат промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовым синим в течение 2 мин. Споры, окрашенные в ярко-красный цвет, четко выделяются на голубом фоне цитоплазмы.

Способ Пешкова (1924) наиболее простой и демонстративный; он не требует химических протрав и дифференцировки.

Приготовить тонкий мазок. Зафиксировать на пламени горелки. Окрасить кипящей леффлеровской метиленовой синькой (над пламенем спиртовки) в течение 15–20 секунд. Промыть водой. Докрасить 0,5% водным раствором нейтрального красного в течение 30 секунд. Промыть водой и

высушить. Споры голубого или синего цвета, молодые споры черно-синие, цитоплазма вегетативных форм розовая.

Выявление включений в клетках микроорганизмов.

Чтобы обнаружить *гликоген*, берут культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На чистое предметное стекло наносят небольшую каплю жидкой культуры микроорганизма, добавляют к ней каплю раствора йода в йодиде калия (7 г йода и 20 г йодида калия в 100–300 мл дистиллированной воды). Накрывают покровным стеклом, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препараты клеток микроорганизмов просматривают в микроскоп с масляной иммерсией. Клетки с гликогеном окрашиваются в желто-коричневые и коричнево-бурые цвета.

Для окрашивания *гранулезы* берут небольшую каплю суспензии маслянокислых бактерий, добавляют каплю раствора йода в йодиде калия (1 г йода кристаллического + 2 г йодида калия в 100 мл воды), накрывают покровным стеклом, удаляют излишнюю жидкость фильтровальной бумагой. Препарат просматривают с масляной иммерсией. При этом следует найти крупные подвижные палочковидные клетки (раствор Люголя не убивает их). Раствор Люголя окрашивает в сине-фиолетовый цвет гранулезу, которая обычно локализуется у конца клетки. У некоторых клеток гранулеза занимает большую часть клетки.

Для обнаружения *жира* берут старую культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На предметное стекло наносят небольшую каплю 40% раствора формалина. Петлей в нее вносят культуру микроорганизма. Формалин уби-вает клетку и разрывает ее оболочку. Через 5 мин. в эту же каплю добавляют небольшую каплю метиленового синего, а спустя 10 мин. – каплю Судана III (растворимого в жире красителя, индикатора жироподобных веществ). Затем каплю накрывают покровным стеклом и удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой. Препарат просматривают под микроскопом с масляной иммерсией. Видны ярко-красные включения жира в сине-голубых клетках.

Выявление капсулы у бактерий.

Некоторые виды бактерий образуют слизистые капсулы. При обычных методах окраски они остаются бесцветными. Для выявления их применяют специальные негативные методы окраски.

Негативный метод Бурри. Каплю туши помещают на хорошо обезжиренное смесью спирта с эфиром предметное стекло и смешивают каплей жидкости, содержащей бактерии. При помощи покровного стекла распределяют мазок тонким слоем по поверхности предметного стекла. После того как препарат высохнет на воздухе, его рассматривают с иммерсионной системой. На темно-дымчатом фоне ясно видны неокрашенные капсулы и клетки бактерий.

Для исследования капсул наиболее удобно использовать клетки азотобактера.

Окраска по Романовскому – Гимзе. Позволяет выделить ядерные элементы бактериальных клеток и гранулы волютина. Для окраски берут каплю готовой краски на 1 мл воды (рН=7,2). Препарат помещают в чашку Петри мазком вниз, подложив кусочки предметных стекол. Краску подливают под мазок, наблюдая, чтобы не было воздушных пузырей. Длительность окрашивания – 1–24 часа. После препарат промывают слегка подщелоченной водой и высушивают. Протоплазма молодых клеток окрашивается в сине-фиолетовый цвет, ДНК – в красно-фиолетовый.

Практическая работа

1. Приготовить прижизненный и фиксированный препараты сенного настоя. Прижизненный препарат промикроскопировать, пользуясь объективом ВИ-40; мазок – с объективом МИ-100. Фиксированный препарат окрасить методом Грамма.

2. Провести окрашивание по Граму бактерий, полученных в чистой культуре от преподавателя.

3. Приготовить и просмотреть препарат бактерий рода *Bacillus*. Окрасить споры.

4. Приготовить и просмотреть препарат дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Окрасить для выявления жира и гликогена. Промикроскопировать.

5. Сделать зарисовки.

Оборудование: микроскопы, культуры микроорганизмов, красители и вспомогательные растворы: карболовый фуксин Циля, метиленовый синий Леффлера, 5% раствор хромовой кислоты, 1% раствор соляной (или серной) кислоты, раствор йода в йодиде калия, 40% раствор формалина, метиленовый синий (1:40) и судан III, генциановый фиолетовый, спирт бактериологическая петля, предметные и покровные стекла, тушь.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность метода окрашивания бактерий по Граму?
2. Какие факторы оказывают влияние на результат окрашивания по Граму?
3. Какие существуют модификации метода окрашивания по Граму?
4. В чем отличия грамположительных и грамотрицательных бактерий?
5. Какой компонент клеточной стенки является обязательным для грамположительных и грамотрицательных бактерий?
6. В чем сущность экспресс-метода Грезерсона?
7. Что значит «грамвариабельный»?
8. Как проводится окраска спор бактерий?

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Бактерии составляют наиболее обширную и разнообразную группу микроорганизмов. Большинство бактерий – это одноклеточные организмы сферической, палочковидной или извитой формы, размножающиеся поперечным делением клетки. Обычно деление происходит путем образования перегородки. У многих бактерий клетки после деления расходятся, у некоторых представителей остаются вместе, образуя различные сочетания. Ряд форм имеет довольно сложный цикл развития. Среди бактерий есть небольшое количество нитчатых форм.

Также есть группа прокариотных микроорганизмов, клетки которых способны ветвиться. Это актиномицеты.

подавляющее большинство бактерий (кроме микоплазм и миксобактерий) обладает твердой оболочкой. Многие представители бактерий являются подвижными организмами. Перемещение большинства подвижных форм осуществляется с помощью жгутиков, которые могут быть расположены полярно или перитрихально. При полярном жгутиковании у бактерий имеется один жгутик (монотрих), два (амфитрих) или более жгутиков (лофотрих).

Жгутики могут располагаться на одном или обоих концах клетки. При перитрихальном жгутиковании жгутики расположены в разных частях клетки.

Некоторым бактериям свойственно образование эндоспор.

Форму и соединение клеток определяют при микроскопировании молодой культуры микроорганизмов, выращенной обычно в жидкой среде. Для этого готовят препараты живых или фиксированных окрашенных клеток и микроскопируют: первые с использованием фазово-контрастного устройства, а вторые – с использованием иммерсионной системы.

Форма клеток бактерий.

Под общим понятием «бактерии» описано свыше 1600 видов микроорганизмов-прокариот, не имеющих настоящего сложноорганизованного ядра. По форме все бактерии можно разделить на шаровидные (или кокки), палочковидные, извитые и нитчатые. Кроме того, существуют нитчатые формы бактерий, а также бактерии необычной формы: звездчатые, кольцевидные, треугольные, амeboидные, пластинчатые и др.

Бактерии шаровидные – *кокки* (греч. *Coccus* – зерно, шарик). Они делятся на следующие группы.

Моно- или *микрোকки* (род *Micrococcus*). Их клетки делятся в любой плоскости и сразу после деления обособляются, располагаясь одиночно.

При делении клеток в одной плоскости клетки могут располагаться попарно, в связи с чем такие формы получили название *диплококков* (род *Diplococcus*).

Стрептококки (лат. *streptos* – цепь) – шаровидные бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости разнообразной длины цепочки (род *Streptococcus*).

Деление кокка в двух взаимно перпендикулярных плоскостях ведет к образованию четырех клеток, или тетракокка (род *Tetracoccus*).

Сарцины (лат. sarceo – соединяю) – шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток. Располагаются они в виде куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (род *Sarcina*).

Некоторые виды сарцин формируют большие сарциноподобные кубообразные пакеты, но уже с каждой стороны находится не по 4 клетки (субъединицы сарцины), а по 4 сарцины. Беспорядочное расположение клеток или образование скоплений, напоминающих гроздь винограда, происходит при делении кокков в разных плоскостях. Такие формы называются *стафилококками* (род *Staphylococcus*).

Помимо правильной шаровидной формы, клетки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки) или бобовидную форму кофейного зерна (гонококки, менингококки). Шаровидные бактерии, как правило, не имеют жгутиков, неподвижны и спор не образуют. Исключение составляет мочева сарцина (*Sporosarcina ureae*).

Палочковидные, или цилиндрические, формы – это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Их различают по величине клеток, расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клетки палочковидных бактерий колеблется от десятых долей микрометра до 10–15 мкм и более, диаметр клетки от 0,5 до 1,0 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры (состава среды, значения рН, аэрации, температуры) и возраста культуры.

Палочковидные бактерии делятся на две группы: *бациллы* и *бактерии*.

Большинство палочковидных микроорганизмов неспорообразующие, они получили название бактерий (гр. *bacteria* – палочка). Палочковидные бактерии, способные при неблагоприятных условиях формировать споры, принято называть бациллами (лат. *bacillum* – палочка).

У мелких бактерий разница между длиной и шириной невелика; по внешнему виду они напоминают кокки, в связи с чем такие формы получили название *коккобактерии* (возбудитель бруцеллеза).

К бактериям принадлежат роды *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

Среди палочковидных форм, образующих споры, различают бациллы (род *Bacillus*) и клостридии (род *Clostridium*).

Бациллы – аэробы, у них споры не превышают толщины вегетативной клетки. С представителями бацилл можно познакомиться на примере микроорганизмов рода *Bacillus*, например, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* (см. рис. 1). В названии первого вида отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложнгрибовидного налета (лат. *mycoides* – грибовидный). Налет имеет вид сложно переплетенных нитей, напоминающих мицелий грибов. Поскольку *Bacillus mycoides* – спорообразующая палочка, цитоплазма клетки, приступившей к спорообразованию, красителем прокрашивается, а спорогенная зона не прокрашивается, и под микроскопом

бацилла выглядит неравномерно окрашенной. Спорогенная зона, как более плотная и непрокрашенная, иначе преломляет свет, чем цитоплазма клетки. Клетки *Bacillus mycoides* относятся к стрептобациллам, так как обычно располагаются цепочками. Для просмотра лучше брать клетки в возрасте 2–3 сут, так как в более позднем все они переходят в стадию спор.

Bacillus subtilis – типичный представитель рода – обнаруживается повсюду в осевшей пыли. На питательных средах образует длинные цепочки, расположенные рядами. На жидких средах растет в виде пленки. Активно расщепляет органические азотистые соединения. Глюкозу использует только в аэробных условиях. Споры выдерживают кипячение до 30 минут, что используется при выделении культуры.

Палочковидные бактерии просматриваются на фиксированных и окрашенных фуксином препаратах.

Клостридии – анаэробы, их споры толще вегетативной клетки.

Клостридии принимают участие во многих процессах в природе. Являются возбудителями анаэробных инфекций. Вызывают аммонификацию белковых веществ, мочевины. Разлагают фосфорорганические соединения. Фиксируют молекулярный азот и др.

Палочки, как и кокки, могут располагаться попарно или цепочкой. При соединении бактерий попарно образуются диплобактерии, при таком же соединении бацилл – диплобациллы. Соответственно образуются стрептобактерии и стрептобациллы, если клетки располагаются цепочкой. Тетрад и пакетов палочковидные формы не образуют, так как они делятся в одной плоскости, перпендикулярной продольной оси.

Извитые формы.

Вибрионы (лат. *vibrio* – трепещущий, вибрирующий) – слегка изогнутые клетки. Клетки вибрионов изогнуты на 1/3–1/4 оборота. Длина клетки составляет 1–3 мкм. К вибрионам относится, например, *Vibrio cholerae* – возбудитель холеры.

Спириллы (лат. *spiro* – штопор). В отличие от вибрионов их клетки более длинные, толстые и извитые. Извитость или равна, или больше половины окружности. Спириллы могут иметь один завиток – в виде русской буквы С, два – в виде латинской буквы S или несколько (в виде спирали). Размеры клетки по сравнению с вибрионами значительно крупнее – 15–20 мкм. Среди спирилл встречаются патогенные и сапротрофные представители. *Spirillum volutans* патогенная спирилла, у человека вызывает лихорадку от укуса крыс.

Вибрионы и спириллы удобно просматривать на фиксированном и окрашенном фуксином препарате, приготовленном из навозной жижи, предварительно инкубированной в течение нескольких суток в термостате. На таком препарате много клеток разных видов микроорганизмов, и среди них часто встречаются извитые формы.

Спирохеты – длинные и тонкие клетки с большим количеством мелких, но крутых завитков. Длина спирохет превышает толщину в 5–200 раз. Число витков спирали является одним из систематических признаков при определении вида. Непатогенные бактерии рода *Spirochaeta* встречаются в пресных и морских водах, а также могут обнаруживаться в зубном налете. Зубные спирохеты чрезвычайно тонкие, почти волосовидные. Среди патогенных для человека спирохет известны представители родов *Borrelia* (вызывают возвратный тиф) и *Treponema* (возбудители сифилиса).

Нитчатые формы, или *трихомные* (гр. *trichoma* – волосы), представляют собой цепочки цилиндрических клеток, часто объединяемые либо слизью, либо чехлами влагалищами, либо плазмодесмами (мостиками), либо общей оболочкой.

Обычно снаружи трихом покрыт дополнительными оболочками, которые не участвуют в образовании перегородок между клетками. В большинстве случаев клетки трихом палочковидны, но у цианобактерий в тонких нитях – цилиндрические клетки, в толстых – дисковидные. Нити трихомных бактерий могут быть свободноплавающими или прикрепленными к субстрату. Примером таких бактерий являются представители родов *Beggiatoa*, *Thioploca* (свободноплавающие), *Thiothrix*, *Sphaerotilus* (прикреплены к субстрату). Многие нитчатые бактерии распространены в илах, почве и водоемах, особенно с высоким содержанием железа. В водоемах они часто образуют охристые осадки. Наиболее часто встречаются железобактерии рода *Leptothrix*, окисляющие закисные формы железа в окисные. Гидрат окиси железа у них откладывается во влагалищах, отчего они имеют желтовато-бурую (охристую) окраску. У тех нитчатых бактерий, которым свойственна дифференциация нити, могут формироваться гонидии – это образования овальной или округлой формы, в некоторых случаях имеющие жгутики.

Миксобактерии (слизистые бактерии). Группа бактерий, стоящих на более высокой ступени развития, чем описанные выше. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму с заостренными или округлыми концами. По мере старения они укорачиваются и переходят в микроспоры, соединяющиеся впоследствии слизью и образующие первичные и вторичные цисты. Из последних в дальнейшем формируются плодовые тела.

Актиномицеты (лат. *actis* – луч, *myses* – гриб) – порядок бактерий, имеющих способность к формированию на некоторых стадиях развития ветвящегося «мицелия», которая проявляется у них в оптимальных для существования условиях.

Диаметр нитей у этих микроорганизмов очень мал, как у бактерий (0,5–0,8 мкм), гифы мицелия длинные и ветвистые, как у грибов. Например, у актиномицетов длина ветвящихся нитей достигает нескольких миллиметров, у настоящих грибов – нескольких сантиметров. С грибами их объединяет также способность размножаться спорами.

На питательных средах актиномицеты образуют пушистые, бархатистые, мучнистые, преимущественно плотные кожистые колонии, рас-

тающиеся с субстратом, иногда они имеют характерный землистый запах. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть погружена в субстрат (субстратный мицелий), другая находится над субстратом (воздушный мицелий). Многие представители актиномицетов продуцируют пигменты, поэтому их воздушный мицелий и особенно колонии окрашены в голубые, синие, фиолетовые, розовые, бурые, коричневые или черные тона. Актиномицеты, образующие диффундирующие в питательную среду пигменты, окрашивают ее в соответствующий цвет.

Нити частично внедряются в субстрат, частично стелются по поверхности и приподнимаются над ней. На концах нитей воздушного мицелия хорошо просматриваются спораносцы со спорами. Спораносцы по строению бывают прямыми, волнистыми, спиральными и мутовчатыми.

Много общего с актиномицетами имеют нокардия, или проактиномицеты, и микобактерии, генетически с ними связанные.

Нокардия (проактиномицеты). Это формы микроорганизмов, переходные между актиномицетами и микобактериями. Воздушный мицелий у них отсутствует или развит слабо. На питательных средах развиваются колонии тестообразной (мягкой) консистенции с характерным мицелиальным ободком. Окраска их так же разнообразна, как и у истинных актиномицетов. В молодом возрасте проактиномицеты образуют мицелий, который вскоре начинает септироваться (в нитях образуются перегородки) и расчленяться на палочковидные фрагменты, в дальнейшем переходящие в укороченные палочки, но чаще в кокки.

Практическая работа

1. Рассмотреть постоянные препараты микроорганизмов различной формы (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*), пользуясь объективом МИ–100. Зарисовать.

2. Приготовить прижизненный и фиксированный препараты микробного консорциума Восток-ЭМ1. Прижизненный препарат промикроскопировать, пользуясь объективом ВИ-40; мазок – с объективом МИ-100. Фиксированный препарат окрасить методом Грамма.

Оборудование: микроскопы, культуры микроорганизмов, красители и вспомогательные растворы: карболовый фуксин Циля, метиленовый синий Леффлера, 5% раствор хромовой кислоты, 1% раствор соляной (или серной) кислоты, раствор йода в йодиде калия, 40% раствор формалина, метиленовый синий (1:40) и судан III, генциановый фиолетовый, спирт бактериологическая петля, предметные и покровные стекла, тушь.

Контрольные вопросы

1. Какие формы имеют микроорганизмы?
2. От чего может зависеть размер и форма бактерий?

3. Какая структура клетки поддерживает форму бактерий?
4. Как располагаются клетки микроорганизмов после деления?
5. Что такое «сарцины»?
6. Какие микроорганизмы называют бациллами?
7. Чем отличаются спириллы от спирохет?
8. Как образуются нитчатые формы бактерий?

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для успешного культивирования микроорганизмов необходимо соблюдать стерильные условия.

Стерилизация

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского языка означает обеспложивание. В микробиологии под стерилизацией понимают уничтожение живых микроорганизмов. Микробиологи стерилизуют среды, посуду, инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах.

Способы стерилизации

Термическая стерилизация:

- стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование),
- прокаливание в пламени,
- стерилизация горячим воздухом,
- дробная стерилизация (тиндализация),
- кипячение.

Холодная стерилизация:

- фильтрование,
- стерилизация ультрафиолетовыми лучами,
- стерилизация химическими средствами.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими свойствами и химическим составом, целью исследования.

Автоклавирование – стерилизация насыщенным паром под давлением.

Этот способ основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Температура кипения воды возрастает при повышении давления (при давлении в 1 атм. t° кипения воды $99,1^{\circ}\text{C}$, а при давлении в 2 атм. – $119,6^{\circ}\text{C}$). Это наиболее распространенный и надежный способ стерилизации в микробиологической практике.

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает особую эффективность данного способа. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Условия повышенного давления пара создают в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – автоклавах. Автоклавы бывают стационарные и переносные, горизонтальные и вертикальные, но принципиальное их устройство одинаково. В стерилизационную камеру из водопаровой камеры через специальные патрубки подается пар, давление которого постепенно возрастает. Температура в стерилизационной камере повышается. Автоклавы снабжены специальными приспособлениями,

регулирующими температуру и давление в стерилизационной камере. Стерилизацию в автоклаве проводят при различных режимах.

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать значение рН среды. При кислой реакции среды многие вещества, входящие в ее состав, могут подвергнуться гидролизу. Если среда щелочная, то при стерилизации выпадают в осадок соли железа, карамелизуются и становятся непригодными для использования бактериями сахара. Чтобы избежать этих явлений, растворы некоторых веществ стерилизуют отдельно при значении рН, обеспечивающем их целостность, и добавляют их в среды после стерилизации. Это частный случай так называемой *раздельной стерилизации*.

Дробная стерилизация (тиндализация) применяется для стерилизации сред, портящихся под действием температур выше 100°C. Этот прием был введен английским ученым Тиндалем. Принцип тиндализации заключается в том, что проводят нагревание среды или ее компонентов при нормальном давлении несколько раз и в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорам. Предполагается, что возникающие из спор клетки погибают при последующем прогревании, не успев образовать новые споры. Прогревание можно осуществлять в парах кипящей воды – «текучим паром». Обработку текучим паром проводят 3 раза по 30–40 мин в автоклаве с незавинченной крышкой или в кипятильнике Коха. Время прогревания отмечается с момента энергичного выделения пара.

Пастеризация – однократный прогрев материала при температурах ниже 100°C.

Пастеризация предложена Пастером. Она предназначена для уничтожения в основном бесспорных микроорганизмов. Пастеризация в подавляющем большинстве случаев не обеспечивает стерильности субстрата. Различают длительную (при температуре 63–65°C в течение 30–40 мин), короткую (при температуре 85–90°C в течение 0,5–1 мин) и мгновенную пастеризацию (при температуре 98°C в течение нескольких секунд).

При таких способах обработки погибает большинство вегетативных форм микроорганизмов, однако споры остаются в жизнеспособном состоянии и при возникновении благоприятных условий начинают интенсивно развиваться. Режим пастеризации определяется устойчивостью материала к термической обработке, предполагаемой зараженностью его микроорганизмами и целью работы. Пастеризацию в лаборатории проводят в термостате или на водяной бане.

Термостат – это прибор, обеспечивающий получение и поддержание стабильной температуры в различных пределах. В микробиологии помимо пастеризации используют для культивирования микроорганизмов, культур клеток, протекания иммунологических или биохимических реакций.

В микробиологической практике пастеризацией сред или посевного материала часто пользуются для выделения чистых культур спорообразующих микроорганизмов и для выявления способности микроорганизмов к образованию спор. Пастеризация широко применяется в пищевой промышлен-

ности для обработки продуктов, теряющих вкусовые и питательные качества при кипячении: молока, ягодных и фруктовых соков, вин, пива и др.

Стерилизация фильтрованием применяется в тех случаях, когда субстраты не выдерживают нагревания. Ее часто используют для сред, содержащих белки, для сывороток, некоторых антибиотиков, витаминов, летучих веществ, например, некоторых углеводов. Этот прием довольно широко используется для стерилизации культуральной жидкости, когда необходимо освободить ее от клеток микроорганизмов, но сохранить все содержащиеся в ней продукты обмена в неизменном виде. Способ заключается в фильтровании жидкостей через специальные фильтры, имеющие мелкопористые перегородки и поэтому задерживающие клетки микроорганизмов.

Диаметр пор определяет область применения фильтров. Чем мельче поры фильтра, тем более пригоден он для стерилизации. Для проверки на стерильность фильтрат в большом количестве высевают на питательную среду. Если в течение пяти дней тест-организм не вырастет, фильтры могут быть использованы для стерилизации.

В настоящее время для стерилизации наиболее широко используются два типа фильтров: мембранные фильтры (изготовлены из коллодия, ацетата, целлюлозы и других материалов) и фильтры Зейтца (изготовлены из смеси асбеста с целлюлозой).

Перед употреблением фильтры должны быть простерилизованы. Рассчитаны на одноразовое использование.

В настоящее время установлено, что при неблагоприятных условиях некоторые виды бактерий способны образовывать наночастицы, которые свободно проходят через любой бактериологический фильтр. Некоторые из наночастиц могут реверсировать в обычные формы, в том числе и патогенные. Это, бесспорно, ограничивает возможности фильтрования как метода стерилизации.

Стерилизация горячим воздухом – это основной способ стерилизации стеклянной посуды. Она осуществляется в сушильных шкафах при температуре 165–180°C в течение двух часов. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Осуществляется в сушильных шкафах.

Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Пробирки должны быть закрыты пробками.

Посуду разворачивают непосредственно перед употреблением.

Прокаливание в пламени (фламбирование).

Мелкие металлические инструменты (петли, иглы, пинцеты, ножницы) стерилизуют прокаливанием в пламени непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при пересевах культур и разливе сред. В пламени погибают и клетки, и споры микроорганизмов.

Кипячение

Некоторые предметы (металлические инструменты, мембранные фильтры) иногда стерилизуют длительным кипячением в дистиллированной воде. Однако нужно знать, что споры некоторых микроорганизмов сохраняют жизнеспособность даже после кипячения в течение нескольких часов. Длительным кипячением также можно стерилизовать питательные среды.

Ультрафиолетовые лучи

Предметы, изготовленные из термолабильных пластмасс, например, центрифужные пробирки, стерилизуют ультрафиолетовыми лучами. Время облучения зависит от мощности используемой бактерицидной лампы и расстояния между лампой и объектом. После облучения предметы до использования следует хранить в стерильной посуде.

Стерилизация химическими средствами

Стерилизацию предметов из термолабильных пластмасс можно производить различными химическими веществами: окисью этилена, сулемой, хлорамином, в крайнем случае, даже крепким спиртовым раствором йода.

Для идентификации необходимо из природных сред выделить микроорганизмы и вырастить их культуры в лабораторных условиях. Для этого необходимо отдельные микроорганизмы вырастить в виде чистых культур и идентифицировать их на основании морфологических и биохимических признаков. Для идентификации используются специальные определители.

Культивирование микроорганизмов

Выращивание (культивирование) микроорганизмов используется в лабораторных и производственных условиях для выделения, накопления и сохранения микроорганизмов.

Популяция микроорганизмов, или *культура* – это совокупность бактерий одного или разных видов, развивающихся в ограниченном пространстве. Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется культивированием, а культивирование при определенной температуре – инкубированием.

По степени однородности клеток культуры делят на *чистые*, *смешанные*, *накопительные*.

Чистые культуры – потомство одной клетки (клон). Чистая культура характеризуется однородностью клеток и колоний. Признаки, которые проявляет культура на жидких и твердых средах, называются культуральными. Методы выделения чистых культур были предложены Р. Кохом в XIX в.

Штамм – культура бактерий одного вида, выделенная из разных источников в разное время.

Вид – совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам.

Смешанные культуры – это потомство клеток 2-х или нескольких видов. Естественные популяции, как правило, представляют собой смесь различных микроорганизмов. Смешанные культуры также могут быть приготовлены путем объединения чистых культур.

Накопительные культуры – это такие культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

Выделение чистых культур микроорганизмов.

Морфологию, физиологию и биохимию микроорганизмов изучают, используя чистые культуры. Выделение чистой культуры включает три этапа:

- получение накопительной культуры;
- выделение чистой культуры;
- определение чистоты выделенной культуры.

Получение накопительной культуры. С целью получения накопительных культур создают элективные условия, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов. При создании элективных условий необходимо знать физиологию форм, интересующих исследователя, или четко представлять те особенности обмена веществ, которыми должен обладать выделяемый организм. Особенно часто элективные условия создают, подбирая соответствующие среды, поскольку различные микроорганизмы для своего развития предъявляют неодинаковые требования к источникам питания. При создании элективных условий следует учитывать неодинаковые отношения различных микроорганизмов к кислотности среды, температуре, аэрации и т.д. Элективные условия для развития грамотрицательных бактерий или дрожжей иногда создают внесением в среду пенициллина, так как грамположительные бактерии при этом или совсем не развиваются, или их развитие замедленно. Элективные условия не всегда оптимальны для роста выделяемого микроорганизма, однако они лучше переносятся им, чем сопутствующими формами. О получении накопительной культуры судят визуально, по появлению характерных признаков развития выделяемых микроорганизмов.

Выделение чистой культуры. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или из одной клетки.

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов до настоящего времени является метод, предложенный Кохом. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки.

При выделении чистых культур аэробных микроорганизмов высев из накопительной культуры проводят на поверхность плотной стерильной среды в чашки Петри. Высев на поверхность среды производят непосредственно из накопительной культуры или из ее разведения в стерильной воде.

Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность среды наносят каплю или «петлю» накопительной культуры или разведения. Нанесенную каплю осторожно распределяют по поверхности среды в чашке Петри сначала в одной, затем по второй половине, после чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдают «сплошной» рост микроорганизмов, тогда как в последующих образуются изолированные друг от друга колонии. Накопительную культуру на поверхность плотной среды можно рассеивать и штриховым способом. Для этого накопительную культуру обычно разводят в стерильной воде в 10–100 раз в зависимости от плотности исходной суспензии. Берут петлю одного из разведений накопительной культуры и проводят зигзагообразную линию или ряд параллельных штрихов через всю поверхность плотной питательной среды в чашке Петри. Такой метод называется «посев петлей».

Также можно применить «посев шпателем». Материал наносят на поверхность питательной среды петлей или пипеткой, а затем втирают его по поверхности агара стерильным шпателем.

«Посев на секторы». Дно чашки расчерчивают на секторы, посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру так, чтобы штрихи с одного сектора не переходили на другой.

«Посев газоном». 1 мл жидкой бульонной культуры наносят пипеткой на поверхность среды и распределяют жидкость по ее поверхности.

После проведения посева чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате 1–7 суток, так как скорость роста различных микроорганизмов неодинакова. Чашки необходимо просматривать ежеднев-но. Выросшие изолированные колонии отсеивают петлей в пробирки на поверхность скошенной плотной среды или в жидкую среду.

Колония – это популяция микробных клеток одного вида, сформировавшаяся в результате деления одной микробной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде при оптимальной температуре.

Изолированные колонии микроорганизмов, относящихся к факультативным аэробам или факультативным анаэробам, чаще получают методом глубинного посева. Непосредственно перед посевом пробирки со стерильной питательной средой (15–20 мл) помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась. Высев проводят из разведений накопительной культуры

в стерильной воде. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48–50°C агаризованной средой вносят 0,5–1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями обеих рук. Затем около пламени горелки вынимают из пробирки пробку, обжигают края пробирки в пламени горелки и быстро выливают содержимое пробирки в чашку Петри. После того, как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. При высеве глубинным способом часть колоний оказывается в толще агара. Такие колонии вырезают стерильным скальпелем или извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых форм.

Выделение чистой культуры анаэробных микроорганизмов по методу Коха требует создания условий, ограничивающих доступ кислорода к культуре. Разведения накопительной культуры и посев в пробирки с плотной питательной средой проводят так же, как и при глубинном посеве. Плотную агаризованную среду после внесения посевного материала и тщательного перемешивания можно оставлять в пробирках. В этом случае поверхность среды для уменьшения диффузии кислорода заливают стерильной замазкой (1 весовая часть вазелинового масла и 3 части парафина). Внутри среды развиваются отдельные колонии. Чтобы извлечь образовавшиеся колонии, пробирку слегка нагревают, все время быстро вращая над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке пробирки, плавится, и содержимое последней в виде агарового столбика легко выскользывает в приготовленную стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии из агара, захватывая их стерильной петлей или ланцетом. Извлеченные колонии переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых организмов. Обычно посев в плотную питательную среду повторяют два-три раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

В микробиологической практике существует несколько методов выделения чистых культур облигатных анаэробов (метод Цейслера, метод Вейнберга, метод Вейона-Виньяля, метод Перетца).

Метод Цейслера. Исследуемый материал рассеивают штрихами по поверхности плотной питательной среды, помещают в анаэробные условия, выдерживают в термостате при 37°C в течение 24–72 ч. Изолированные колонии анаэробов пересеивают в среду Китта – Тароцци.

Выделение чистой культуры из одной клетки.

Получение чистой культуры из одной клетки обычно производится капельным методом Линднера. Этот метод используют при работе с крупными микроорганизмами, такими, как дрожжи, плесневые грибы, водоросли. Для выделения чистой культуры названным методом разведения накопительной культуры проводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капельке разведения были единичные клетки микроорганизмов.

Затем на поверхность стерильного покровного стекла стерильной микропипеткой наносят ряд капель суспензии из приготовленного разведения. Готовят препарат «висячая капля». Нанесенные на покровное стекло капли микрокопируют и отмечают те из них, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат «висячая капля» помещают в чашку Петри, на дне которой находится увлажненная фильтровальная бумага, и чашку ставят в термостат. Через сутки капли снова микрокопируют. Капли, в которых произошло размножение клеток, осторожно переносят в пробирки со стерильной жидкой средой.

Рост микроорганизмов на плотных питательных средах.

Наиболее существенной особенностью роста микроорганизмов на плотной питательной среде является характер колонии (рис. 1). Различают поверхностные, глубинные и донные колонии в зависимости от того, где они развивались – на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда. Поверхностные колонии отличаются большим разнообразием. Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Чаще всего они имеют вид более или менее сплюснутых чечевичек, принимающих в проекции форму овалов с заостренными концами. Лишь у немногих микроорганизмов глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом агаризованной среды вследствие выделения развивающимися микроорганизмами углекислоты или других газов. Донные колонии самых разнообразных микроорганизмов растут в виде тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну. При описании колонии необходимо указывать возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

Различают два основных типа колоний бактериальной культуры. S-тип характеризуется круглой и выпуклой формой, гладкой и влажной поверхностью. R-тип характеризуется шероховатой поверхностью, неправильными краями и сухой консистенцией. Образуются из S-форм в результате мутаций. M-тип характеризуется тягучей слизистой консистенцией, образуются в процессе диссоциации бактериальных культур.

Описание поверхностных колоний проводят по следующей схеме.

Форма колонии – округлая, неправильной формы, ризоидная и т.д.

Поверхность колонии – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.

Профиль колонии – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д.

Блеск и прозрачность – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная.

Цвет колонии – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная.

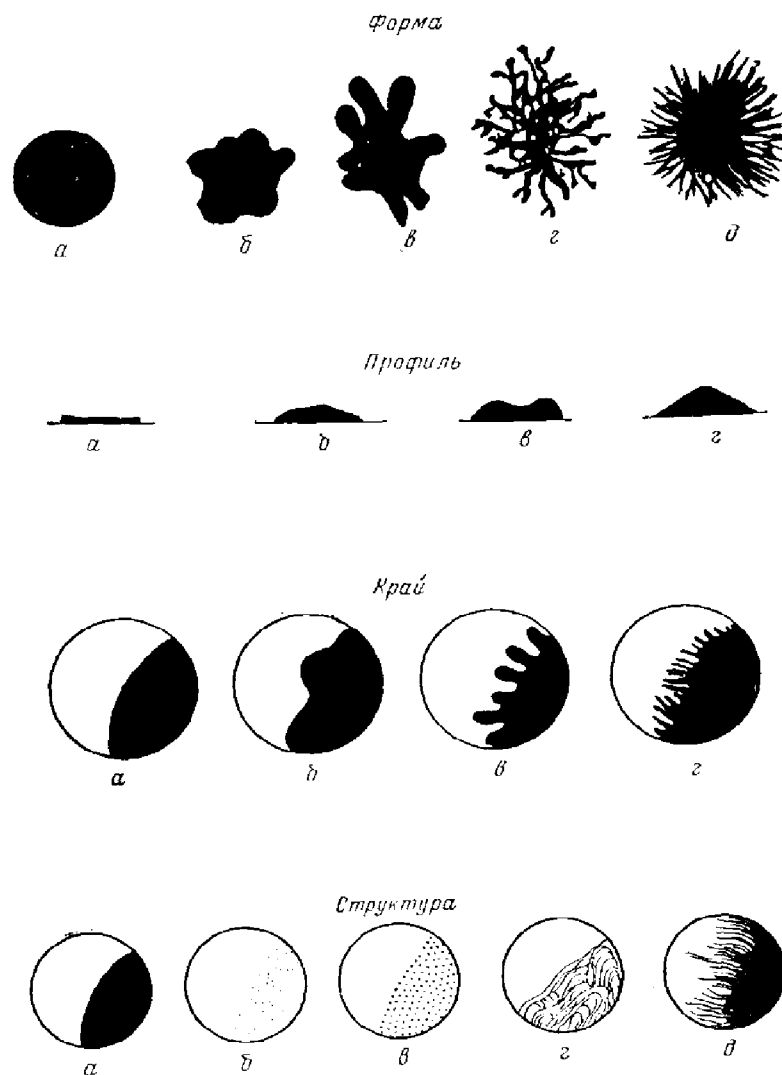


Рис. 1. Характер роста колонии:
 форма колоний: *а*–округлая, *б*–неправильной формы,
в – амебовидная, *г*–ризоидная, *д*–мицелиальная;
 профиль колоний: *а* – плоский, *б*–выпуклый, *в* – кратерообразный,
г–конусовидный; край колоний: *а*–ровный, *б*–волнистый,
в–лопастной, *г* – бахромчатый; структура колоний: *а*–однородная,
б – мелкозернистая, *в*–крупно-зернистая, *г*–струйчатая, *д*–волокнистая

Размер (диаметр) колонии измеряют с помощью обычной линейки или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа и указывают ее величину в миллиметрах. Чашки при этом помещают на столик микроскопа крышками вниз. Точечными называют колонии менее 1 мм в диаметре, но видимые невооруженным глазом. Мелкие колонии имеют 1–2 мм, средние – 2–4 мм и крупные – более 4 мм в диаметре.

Край колонии (ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д.) определяют при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы. Чашку помещают на столик микроскопа.

Структуру колонии (однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д.) определяют при малом увеличении микроскопа или с помощью лупы.

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или растающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, волокнистой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Кроме того, отмечают способность колонии эмульгироваться – одни колонии образуют в физиологическом растворе гомогенную взвесь, у других взвесь зернистая или в виде обрывков пленок.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах.

Характер роста микроорганизмов в жидких питательных средах отличается большим единообразием, чем вид колоний на плотных средах. Микроорганизмы при росте в жидких средах могут вызывать помутнение среды, образование пленок или осадка. Обычно указывают степень помутнения среды – слабая, умеренная или сильная. Мутность среды может быть постоянной или временной, однородной, хлопьевидной, с шелковистой волнистостью и т.д. Если образуется пленка, то отмечают ее характер – тонкая, плотная или рыхлая; гладкая, морщинистая или складчатая. При образовании осадка следует отметить его количество (скудный, обильный и т.д.) и консистенцию (плотный, рыхлый, слизистый). Отличают возраст культуры, состав среды, условия культивирования. В ряде случаев рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, изменением цвета среды, газовыделением. Чтобы установить способность микроорганизмов к газообразованию, в пробирку помещают так называемый «поплавок» – маленькую, запаянную с одного конца трубку. Поплавок помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды, и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. Если рост микроорганизмов сопровождается газовыделением, то образующиеся газы скапливаются в поплавке в виде пузырька.

Питательные среды

Микроорганизмам для роста, развития и размножения необходимы питательные элементы. Синтетические способности микроорганизмов и способы получения ими энергии весьма разнообразны. В связи с этим различны и их требования к источникам питания.

В состав клеток микроорганизмов входят органогенные (С, О, Н, N), зольные макроэлементы (Р, S, К, Mg, Са, Fe) и микроэлементы, которые в малых дозах стимулируют рост клеточной массы, а в больших тормозят его. К ним относятся Zn, Mn, В, Cu, Мо, Со и др.

В сухом веществе клеток содержится, %: С – 50, N – 10-13, Н – 8, О – 20, P₂O₅ – 4, K₂O – 3, (SO₄)²⁻ – 1, MgO – 0,8, CaO – 1, Fe₂O₃ – 0,08, микроэлементов – следы.

Для культивирования микроорганизмов используют специальные питательные среды, которые должны содержать необходимые питательные вещества и являться оптимальной средой обитания микроорганизмов.

При составлении питательных сред необходимо учитывать потребность микроорганизмов в элементах питания.

По физическому состоянию различают: *жидкие, полужидкие, сыпучие и плотные среды*.

Жидкие и полужидкие среды широко применяют для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы.

Сыпучие среды применяют в промышленной микробиологии. К ним относятся: отруби, кварцевый песок, разваренное пшено.

Плотные среды используют для выделения чистых культур (получение изолированных колоний), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов и других целей.

Для уплотнения сред применяют *агар-агар, желатину и кремнекислый гель*.

Агар-агар – сложный полисахарид, получаемый из морских водорослей. Агар-агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не использует его в качестве питательного субстрата. В воде агар-агар образует гели. Температура плавления 2% геля около 90°C, застывания – 40–50°C. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы при любой подходящей для их роста температуре.

Желатина – кислый азотсодержащий продукт, добываемый при выварке костей и хрящей. Желатина представляет собою белковое вещество, которое разлагается под влиянием многих микроорганизмов, в частности под влиянием гнилостной микрофлоры и грибов. При нагревании в воде желатина дает коллоидный раствор, который при охлаждении образует гель.

В качестве плотных питательных сред широко применяют также гелевые пластины, введенные в микробиологическую практику С.Н. Виноградским.

По составу среды подразделяются на две группы: *естественные (натуральные) и синтетические*.

Естественными обычно называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. Их основа – различные части растений, животные ткани, солод, дрожжи, навоз, почва, вода морей, озер и минеральных источников. Большинство их используют в виде экстрактов или настоев. На естественных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как есть все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако среды с неопределенным составом малопригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они не позволяют учесть потребление ряда компонентов среды, а с другой стороны, выяснить, какие вещества образуют микроорганизмы. Это связано с тем, что состав естественных сред очень сложен и непостоянен, так как существенно колеблется в зависимости от сырья и способа приготовления сред. Это

заметно влияет на рост микроорганизмов. Естественные среды используют главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей.

Примерами служат мясопептонный бульон, почвенная вытяжка, картофельная среда.

Искусственные среды (синтетические среды) – это среды, в состав которых входят только определенные, химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Синтетические среды удобны для использования при изучении обмена веществ микроорганизмов. Зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно изучить их потребление и превращение.

Для разработки синтетических сред необходимо знать потребности микроорганизмов в источниках питания и основные особенности их обмена веществ.

Существуют и так называемые «*полусинтетические*» среды, относящиеся к средам с неопределенным составом. В них наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Например, в мясопептонную среду наряду со сложными и неопределенными по химическому составу веществами (мясной бульон) иногда входят пептон, глюкоза или сахароза, поваренная соль, фосфат калия; картофельные среды содержат глюкозу и пептон. Полусинтетические среды широко используют в микробиологической практике для получения витаминов, антибиотиков, аминокислот и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Биохимические свойства выделенных микроорганизмов изучают путем культивирования их на *элективных и дифференциально-диагностических средах*. Определенные ферменты, образующиеся в результате метаболических процессов у бактерий, изменяют индикаторные вещества питательной среды, вследствие чего можно судить о принадлежности микроорганизма к определенной группе, роду или виду.

Элективные среды обеспечивают развитие одного вида или группы микроорганизмов и непригодны для развития других. Такие среды применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного местообитания или для получения накопительных культур. Иногда элективные среды позволяют вести биологические процессы в лаборатории и в производстве без предварительной стерилизации среды.

Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т.д.).

Для крайне специализированных микроорганизмов особенно легко создать элективные условия. Так, минеральная среда, не содержащая связанного азота, на свету строго избирательна для цианей, фиксирующих азот. Если ту же среду дополнить органическим источником энергии

и углерода, то на ней в темноте в аэробных условиях будет развиваться *Azotobacter*, а при исключении доступа воздуха – *Clostridium*.

Элективные среды в практику микробиологии были введены С.Н. Виноградским.

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды позволяют достаточно быстро отличить одни виды микроорганизмов от других. Состав этих сред подбирают с таким расчетом, чтобы позволить четко выявить наиболее характерные свойства определенного вида.

Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т.е. при получении накопительной культуры. Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды. В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить клоны, сбраживающие лактозу от клонов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный (пептонный) агар, углевод и основной фуксин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа). Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развивается красная окраска соответствующих колоний.

Индикаторные среды применяются в клинической бактериологии, при генетических исследованиях.

Универсальных сред, пригодных в равной степени для всех микроорганизмов, не существует. В закономерности от особенностей обменных процессов (фотосинтез, способы получения энергии и т.д.) отдельным видам микроорганизмам требуются различные составы питательных веществ.

Помимо набора питательных элементов при изготовлении питательных сред важно учитывать требования микроорганизмов к кислотности среды. Для каждого микроорганизма имеется своя оптимальная зона рН, в пределах которой он может нормально развиваться. Большинство микроорганизмов предпочитают нейтральную среду и испытывают угнетение в более кислых или щелочных условиях. Но есть кислотолюбивые и щелочелюбивые микроорганизмы. В процессе стерилизации рН сред может изменяться.

Поэтому после стерилизации требуется дополнительная проверка рН среды и его корректировка.

Аэрация.

Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия в способах их культивирования.

Аэробные микроорганизмы обычно культивируют поверхностно на твердых или жидких средах. В этом случае микроорганизмы развиваются на поверхности среды и получают кислород непосредственно из воздуха.

Иногда возможно глубинное культивирование в жидких средах. Для этого микроорганизмы выращивают на качалках, обеспечивающих перемешивание среды в колбах и насыщение ее кислородом. Иногда продувают стерильный воздух через культуральную жидкость.

Выращивание анаэробов более сложно, чем аэробов, так как они должны быть изолированы от доступа воздуха. Для этого обычно применяют высокий слой среды, почти до пробки. Посевной материал вносят на дно сосуда. Поверхность заливают стерильным парафином. Иногда, увеличивая количество агара-агара (0,2–0,3%), загущают жидкую среду.

Иногда микроорганизмы выращивают в толще агаризованной среды. Этим приемом пользуются для получения изолированных колоний при выделении чистых культур и при количественном учете. Осуществляют глубинный посев. Для этого разведенный посевной материал вносят в расплавленную и остуженную до 50°C среду, перемешивают и переливают в стерильные сосуды для культивирования. Поверхность среды можно залить парафином.

Иногда из сосудов для культивирования воздух откачивают при помощи специальных приборов.

Некоторые анаэробные микроорганизмы можно выращивать и при доступе воздуха, но совместно с аэробами. Аэробы поглощают кислород воздуха, соприкасающегося с его поверхностью, и не пропускают в более глубокие слои, где создаются анаэробные условия. После того, как развившийся аэроб поглотит кислород, начнет развиваться анаэроб.

Температура

Микроорганизмы различаются по своему отношению к температуре:

- температура 0–20°C – психрофилы;
- температура 25–37(до 45)°C – мезофиллы;
- температура 45–65(до 70)°C – термофилы.

Отклонения температуры от оптимума неблагоприятно влияют на развитие микроорганизмов.

Практическая работа

1. Приготовить мясо-пептонный агар (МПА) и бактериальный питательный агар и разлить в чашки Петри и пробирки (скошенный агар).

2. Постановка элективной культуры сенной палочки.

Bacillus subtilis (сенная палочка) легко выделяется из сенных настоев. Для этого 1 часть сена заливают 10 частями воды и для нейтрализации среды прибавляют мел; после пастеризации при 80°C в течение 15 мин. настой сливают и оставляют его при температуре 25°C (проверить еще раз кислотность); через 24–28 часов на поверхности экстракта образуется пленка *Bacillus subtilis*, тонкой подвижной спороносной палочки, клетки которой часто соединены в длинные нити.

Поставьте еще одну точно такую же культуру, но кипячения не проводите.

3. Влияние отдельных питательных элементов на развитие *Aspergillus niger*.

Готовят несколько вариантов питательных сред, из которых один – полная питательная среда без микроэлементов (*Aspergillus niger* развивается на этой среде хорошо), остальные – та же среда с исключением того или иного элемента или с добавлением микроэлемента. По росту гриба на питательных средах судят о значении исключаемого элемента или добавленного микроэлемента для развития гриба.

Варианты питательных сред

1. Полная питательная среда без микроэлементов, %: сахара–10,0; NH_4NO_3 –0,3; KH_2PO_4 –0,2; MgSO_4 –0,05; Fe_2SO_4 –0,01.

2. Та же среда без углерода. Исключена сахара. Для компенсации осмотической активности среды можно внести соответствующее по осмотическому эквиваленту количество хлорида натрия. NaCl не оказывает влияния на развитие гриба.

3. Среда без азота. Исключен NH_4NO_3 .

4. Среда без фосфора. Исключен KH_2PO_4 , он заменен другой солью, содержащей эквивалентное количество калия. Например, KCl . При замене одной соли другой катион замещается натрием, анион – хлором; NaCl не оказывает влияния на развитие гриба.

5. Среда без калия. Исключен KH_2PO_4 , он заменяется эквивалентным количеством NaH_2PO_4 .

6. Та же среда без серы. MgSO_4 и FeSO_4 заменяют эквивалентными количествами MgCl_2 и FeCl_3 , закисную соль железа можно заменить окисной.

7. Та же среда без магния. MgSO_4 заменяют эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

8. Та же среда без железа. FeSO_4 заменяют эквивалентным количеством Na_2SO_4 .

9. Та же среда с добавлением микроэлементов. В одном варианте в состав среды вводят ZnSO_4 , в другом – MgSO_4 , в третьем – H_3BO_3 . Концентрация – 0,01%.

Перед составлением питательных сред нужно рассчитать эквивалент – процент тех солей, которые вводят вместо исключаемых.

При постановке опыта для каждого варианта рассчитывают количество всех веществ в граммах на 30 мл среды. Так как *Aspergillus niger* – аэробный организм, то опыт ставят в колбах Эрленмейера емкостью 75–100 мл.

Рассчитывают все ингредиенты для каждого варианта в миллилитрах и вносят в колбу. Далее их объем суммируют и вычитают из 30 мл. Полученная разность показывает, сколько дистиллированной воды надо добавить.

В колбы со стерильной средой вносят споры гриба *Aspergillus niger*. Каждую колбу закрывают ватной пробкой и прикрепляют этикетку с указанием варианта.

Спустя 7 суток проводят анализ опыта. Выросшую пленку в первом варианте берут за стандарт. Обычно в этом варианте рост гриба хороший (пленка мощная). С первым вариантом сравнивают все остальные. Оценка роста гриба визуальная. Для более точной оценки роста гриба в каждом варианте пленки его можно высушить при 105°C до постоянной массы. Первый вариант принимают за 100%.

Отделение клеток микроорганизмов от культуральной жидкости возможно центрифугированием или фильтрованием.

Центрифугированием отделяют обычно бактериальные или дрожжевые клетки. Для этого в центрифужную пробирку наливают точно отмеренный объем тщательно перемешанной культуры. После центрифугирования сливают надосадочную жидкость и промывают осадок дистиллированной водой. Затем снова центрифугируют. Сливают воду, а осадок оставляют в центрифужной пробирке или переносят в стеклянный бюкс.

Фильтрование можно проводить, используя обеззоленные бумажные, мембранные или стеклянные фильтры. Мицелий актиномицетов или плесневых грибов отделяют от культуральной жидкости с помощью бумажных фильтров. Бумажный фильтр помещают в обычную стеклянную воронку и фильтруют через него, как и при центрифугировании, точно отмеренный объем культуры (обычно от 5 до 10 мл). Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой. Для отделения бактериальных клеток используют мембранные фильтры различных размеров.

Для измерения веса сухой биомассы центрифужную пробирку (бюкс) или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают до постоянной массы.

На средах с исключением того или иного элемента, особенно если в нем большая потребность, гриб не растет или растет очень слабо. Если элемент требуется в очень небольших количествах, например FeSO_4 – 0,01%, то исключение его мало сказывается на росте клеточной массы, так как гриб использует примеси этого элемента в реактивах.

Оборудование: весы, колбы и мерные цилиндры, стакан химический, стерильные пробирки с ватными пробками, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки, стерильная вода в пробирках, стерильный мел; мясо-пептонный бульон, агар-агар; универсальный рН-индикатор, капельницы

с бромтимол-блау, 10%-ми растворами кислоты и щелочи; водяная баня, штатив для пробирок, дезинфицирующий раствор, чернила или карандаш по стеклу, реактивы для приготовления питательных сред.

Контрольные вопросы

1. Какие методы стерилизации вы знаете?
2. Какие бывают культуры микроорганизмов?
3. Какие бывают питательные среды?
4. Как проводится культивирование аэробных микроорганизмов?
5. Как проводится культивирование анаэробных микроорганизмов?

МИКРОФЛОРА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Микроорганизмы распространены в природе повсеместно. Средой их обитания служит почва, вода, растения, животные и человек; они населяют и воздух. Широкому распространению микроорганизмов способствуют: большая скорость их размножения – при благоприятных условиях деление клетки микроорганизма происходит каждые 20–30 мин; незначительные размеры клеток, что позволяет им разноситься с потоками воздуха, с пылью, а также насекомыми; легкая приспособляемость и большая устойчивость к различным воздействиям окружающей среды; они могут обитать, казалось бы, в совершенно непригодных для жизни условиях: горячих источниках с температурой выше 100°C, в почвах с высокими (20–25%) концентрациями солей, в глубинах океанов, во льдах Арктики и Антарктики, песках пустынь и т.д.; большое разнообразие источников питания и способов получения энергии.

Микроорганизмы всеядны, они используют для питания все без исключения природные вещества, а также многие соединения, синтезированные человеком. Большое влияние на распространение микроорганизмов оказывают географические и климатические условия. В зависимости от среды обитания численность микроорганизмов и их видовой состав будут различными.

Микрофлора почвы

В почве живут и развиваются самые разнообразные микроорганизмы – бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и простейшие. Благодаря их жизнедеятельности миллионы лет совершается круговорот веществ и энергии, связывающий органический и неорганический мир природы.

Микроорганизмы обнаружены даже на глубине около 5 м, но наиболее многочисленны в верхнем слое почвы (до 20 см). Особенно широко представлены в почве аммонифицирующие (гнилостные), маслянокислые, целлюлозоразрушающие, денитрифицирующие, нитрифицирующие и азотфиксирующие группы микроорганизмов.

Численность микроорганизмов и их отдельных групп может довольно сильно колебаться в течение года и даже месяца в зависимости от температуры и влажности почвы, состояния растительного покрова и других условий. Наиболее значительные изменения наблюдаются в южных районах, где летом ощущается дефицит влаги, особенно на неорошаемых почвах.

Численность микроорганизмов и состав микробных сообществ зависят также от типа почвы. Так, в подзолистых и дерново-подзолистых почвах присутствует около 1 млн. клеток микроорганизмов, в черноземных и каштановых – 3,4–3,6 млн., в бурых и сероземных – 4,5 млн. клеток в 1 г почвы. Для всех почв характерна активизация деятельности микроорганизмов весной.

Почвенные микробы распределены в пахотном слое неравномерно. Подобно всем другим организмам, они скапливаются там, где больше всего

питательных веществ. Таким местом, в частности, служит прикорневая зона высших растений, называемая ризосферой.

В процессе жизнедеятельности растения через корневую систему выделяют в почву различные вещества, которые могут усваивать микроорганизмы. Наряду с корневыми выделениями растений микробы используют отмершие ткани корней, корневые волоски и постоянно обновляющиеся их части (слушивающиеся клетки корневых чехликов, эпидермиса корня и т.д.).

Вследствие описанных процессов в непосредственной близости от корней высших растений и образуется зона, благоприятная для развития микроорганизмов. В ризосфере некоторых растений численность микроорганизмов достигает миллионов и даже миллиардов клеток на 1 г почвы, что в десятки и тысячи раз больше, чем в почве без растений.

Микроорганизмы ризосферы отличаются от микроорганизмов остальной почвы не только численностью, но и составом. В ризосфере широко представлены азотфиксирующие микроорганизмы, неспоровые бактерии, микобактерии, маслянокислые бактерии и водоросли. Численность клеток отдельных групп бактерий – азотфиксаторов в этой зоне может составлять от сотен тысяч до миллиардов на 1 г почвы. Здесь более интенсивно развиваются аммонификаторы, нитрификаторы и денитрификаторы. Высокая концентрация микроорганизмов в ризосфере способствует развитию в этой зоне питающихся бактериями простейших и нематод.

Известно, что ежегодно в почву поступает огромное количество органического вещества, которое с помощью микроорганизмов распадается до более простых химических соединений (сахаров, органических кислот, аминокислот, белков, жиров, восков, смол, дубильных веществ, целлюлозы, лигнина и др.). Одна часть этих соединений становится пищей почвенных микроорганизмов, другая, более стойкая, подвергается всевозможным превращениям.

Микроскопические организмы, разлагая в почве растительные остатки, образуют соединения, служащие структурными единицами молекул гумусовых веществ. Отдельные из этих веществ создают сами микроорганизмы. Наконец, многие микроорганизмы вырабатывают ферменты, способствующие конденсации (сгущению) соединений, при определенных условиях превращающихся в гумусовые.

От 85 до 90% органического вещества почвы приходится на долю гумуса. Это почвенное образование, содержащее основные элементы питания растений (азот, фосфор, калий, серу и др.), имеет особое значение для земледелия. Гумусовые вещества относительно устойчивы, но медленно разлагаются микроорганизмами. Содержание гумуса определяет плодородие почвы. Поэтому увеличение его количества способствует повышению плодородия почвы и росту урожайности сельскохозяйственных культур.

Химические и биохимические реакции между физиологическими группами микроорганизмов связывают почвенные процессы в единое целое, обладающее определенной внутренней устойчивостью к воздействию

внешней среды. Метаболизм почвы зависит от системы взаимосвязей внутри сообщества микробов. Роль микроорганизмов в почве состоит в разложении органических звеньев экологической системы.

В почве встречаются микроорганизмы – возбудители гниения плодов и овощей, а также болезнетворные бактерии, вызывающие столбняк, ботулизм, газовую гангрену, сибирскую язву, многочисленные кишечные инфекции. Поэтому попадание таких микроорганизмов на фрукты и овощи может привести не только к порче и снижению их качества, но и к пищевым отравлениям и даже, инфекционным заболеваниям.

Микробиологическое исследование любой среды, в том числе и почвы, включает определение общего количества сапротрофных микроорганизмов, определение количества микроорганизмов различных эколого-трофических групп, определение микробов-антагонистов и выявление их активности, определение санитарно-показательных микроорганизмов (кишечной палочки).

Для обеспечения роста микроорганизмов в искусственных условиях используют различные питательные среды.

Метод прямого посева почвенных микроорганизмов на твердую питательную среду.

Метод Д.М. Новогрудского. Это метод определения численности микроорганизмов в почве с помощью непосредственного высева почвенного мелкозема на агаризованную воду. Поскольку агаризованная вода (вода, содержащая 1,5–2% агар-агара) представляет собой крайне бедный питательный субстрат, микроорганизмы развиваются преимущественно за счет использования тех минеральных и органических веществ, которые имеются в самой почве.

Исследуемую почву предварительно подсушивают и пропускают через сито с отверстиями в 0,25 мм. Для посева берут 50 мг мелкозема и с помощью посевной воронки равномерно распределяют по поверхности вылитого

в чашку Петри водного агара. Посевная воронка представляет собой стеклянную трубку с оттянутым концом, снабженную краном. Такую воронку можно легко приготовить, отрезав нижний конец бюретки.

Во время посева слегка приоткрывают кран и держат воронку чуть наклонно, что облегчает равномерное распределение посевного материала. На агаре вокруг комочков мелкозема тотчас же образуются водные пленки, в которых через некоторое время развиваются микроорганизмы.

Через 1–2 суток после посева подсчитывают количество комочков, на которых развиваются плесневые грибы. Гифы гриба легко обнаружить при микроскопировании поверхности агара при малом увеличении микроскопа. В более поздние сроки учет грибов становится невозможным, так как грибные нити разрастаются по всей чашке. Подсчет комочков с развивающимися в их водных пленках бактериями производят на 3–5 день после посева, подсчет актиномицетов через 10–15 суток. Учет всех вышеперечис-

ленных микроорганизмов производят на одной и той же чашке. Чтобы не загрязнить поверхность агара при подсчете воздушной микрофлорой, из агаровой пластинки каждый раз вырезают с помощью стеклянной трубки по пять кружочков диаметром в 1 см (один в центре пластинки и четыре по краям). Каждый кружочек переносят на предметное стекло и разрезают бритвой параллельно диаметру на 4 дольки. Каждую дольку разделяют еще на 3 полоски, каждую из которых микроскопируют отдельно. При малом увеличении микроскопа вся полоска уместается в поле зрения, что значительно облегчает подсчеты. Общее число активных частиц пересчитывают на всю площадь агаровой пластинки и затем на 1 г почвенного мелкозема.

Метод Д.М. Новогрудского позволяет получить более правильное представление о естественных взаимоотношениях между микроорганизмами в почве, чем метод посева почвенных болтушек на соответствующие плотные или жидкие среды.

Посев микроорганизмов почвы на твердую питательную среду с использованием метода последовательных разведений. Чашечный метод Коха.

В связи с тем, что в большинстве естественных субстратов содержится значительное количество микроорганизмов, необходимо метод питательных пластин сочетать с методом последовательных разведений. При учете количества микроорганизмов в почве обычно анализируют среднюю пробу, которую получают, перемешав пробы, взятые с соблюдением правил асептики, из разных мест исследуемого участка.

Чашечный метод Кохашироко используется для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в почве и других естественных субстратах. Применение его позволяет не только учесть численность микроорганизмов, но и оценить их разнообразие по морфологии колоний. Почвенные образцы берут с помощью стерильной ложки, исследование проводится в день взятия образцов. Сущность метода заключается в высеве исследуемой пробы почвы на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. При этом считают, что каждая колония является результатом размножения одной клетки. Работа проводится в три приема: приготовление разведений, посев в чашки, подсчет выросших колоний.

Посев делают из разведений суспензии в зависимости от предполагаемого количества микроорганизмов в исследуемом субстрате. Разведения делают в стерильной водопроводной воде или изотоническом растворе хлористого натрия. В ходе опыта используют постоянный коэффициент разведения. Образец анализируемой почвы (1–10 г) помещают в колбу со 100 мл стерильной воды и встряхивают. Приготовление разведений описано в приложении 9. Степень разведения устанавливается предполагаемым количеством микроорганизмов в образце: число разведений тем больше, чем больше микроорганизмов в исходном субстрате.

Посев производят на агаризованные среды в чашки Петри. Для определения суммарной численности микроорганизмов используют мясо-пептонный или рыбопептонный агар (МПА, РПА), для определения содержания грибов в почве – сусло-агар (СА) или агар Чапека, для определения численности различных физиологических групп и санитарно-показательных микроорганизмов используют соответствующие питательные среды. В стерильные чашки Петри наливают расплавленную на водяной бане агаризованную среду, по 20–30 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока не застынет агар. Стерильной пипеткой наносят определенный объем (обычно 0,1–0,5 мл) соответствующего разведения, предварительно тщательно перемешанного, на поверхность агаровой пластинки в чашку Петри. Данный объем распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Затем этим шпателем проводят по всей поверхности среды во второй и третьей чашке, куда посевной материал не вносили (метод истощающего посева).

Из каждого разведения делают 4–6 параллельных высевок. Чашки с засеянными средами помещают в термостат, отрегулированный на температуру, благоприятную для развития выявляемых организмов. Подсчет бактерий производят при культивировании с температурой 30°C через трое суток, при комнатной температуре – через семь суток. Подсчет дрожжей и грибов – при комнатной температуре через 3–10 суток (при температуре 25°C срок наблюдения за грибами может быть сокращен до 2–3 дней).

Подсчитывают количество колоний, выросших в чашке Петри, и делают пересчет на 1 г. Результаты параллельных высевок суммируют и вычисляют среднее число колоний, выросших при высеве из этого разведения. Колонии считают, не открывая чашки Петри. Лучшим разведением считают тот, при высеве из которого на плотной питательной среде возникает от 50 до 100 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты отбрасывают и для расчета количества клеток в исходном субстрате не используют. Желательно, чтобы общее количество подсчитанных колоний при высеве из данного разведения было не менее 300.

Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл) исходного субстрата вычисляют по формуле:

$$T = a \times b \times c / d,$$

где T – количество микроорганизмов в 1 г, a – количество подсчитанных колоний, b – разведение, из которого произведен высев, c – 10 (если на чашки высевали 0,1 мл суспензии), d – масса субстрата (почвы), взятого для анализа.

Приготовление разведений и высевы желательно производить в ламинар-боксе.

Описанный метод применим для учета аэробов и факультативных анаэробов. Для учета строгих анаэробов чашки Петри после посева помещают в анаэробные условия.

Экологические методы исследования почвенных микроорганизмов.

Метод обрастания стекол (по Росси–Холодному). Метод позволяет наблюдать «микробные пейзажи». В небольшом почвенном разрезе одну из стенок зачищают и, сделав ножом вертикальную щель, закладывают в нее стерильные предметные стекла, плотно прижимая их к почве. Закапывают разрез, отмечая колышком местонахождение препаратов. Если почва содержит достаточно влаги, то закопанное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и минерального происхождения. В этой среде поселяются и активно развиваются различные микроорганизмы, образующие на стеклах характерные для данной почвы микропейзажи. По истечении срока экспозиции (не менее одного месяца) стекло осторожно отделяют от почвы (нескользящим движением), подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, препарат осторожно отмывают водой от крупных частиц почвы (для этого можно оставить стекло в стакане с водой в наклонном положении на несколько часов), окрашивают 1% карболовым эритрозинем в течение 1 часа во влажной камере, промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. Метод широко применяется в микробиологической практике. С помощью этого метода впервые оказалось возможным наблюдение за распределением различных микроорганизмов в их природной среде обитания, наблюдение за формой и размерами группировок микроорганизмов, их взаимоотношениями.

Модификации метода заключаются в том, что стекла перед помещением в почву покрывают какой-нибудь питательной средой (крахмало-аммиачным агаром, например, согласно модификации Рыбалкиной и Кононенко) или специфическим субстратом (например, фильтровальной бумагой, льняной тканью и т. д.).

Метод люминесцентно-микроскопического наблюдения микроорганизмов в почвенных монолитах (по Звягинцеву). Готовят цилиндрическую формочку (диаметр и высота по 1 см) из нержавеющей стали, пластмассы или стекла, имеющую острые края. Вдавливают формочку в почву исследуемого горизонта и осторожно вынимают ее так, чтобы над краями формочки возвышался слой почвы. Острой бритвой срезают почву, чтобы верхняя грань монолита была на уровне краев формочки. На поверхность почвы капают водный раствор акридинового оранжевого (1:1000) и накрывают ее очень тонким покровным стеклом (0,10–0,12 мм). Через 10–20 мин исследуют в люминесцентном микроскопе с иммерсионным объективом ($\times 100$) в отраженном свете. Основные трудности метода заключаются в подборе подходящей концентрации красителя; для каждой почвы она подбирается опытным путем.

Санитарно-микробиологический анализ почвы.

В практике сравнительно редко встречается возможность прямой количественной оценки опасной микрофлоры, гораздо чаще приходится прибегать к косвенному методу – определению суммарного микробного обсеменения того или иного объекта. При этом исходят из предположения о том, что вероятность проникновения в объект потенциально опасной

микро-флоры будет тем выше, чем большими окажутся величины «микробного числа».

Критерий суммарного микробного обсеменения объектов внешней среды служит основанием только для приближенных, относительных оценок. Тем не менее, этот показатель имеет определенную сравнительную ценность и поэтому широко используется в санитарно-микробиологической практике. Почвы считаются чистыми, если в 1 г почвы содержатся десятки тысяч микроорганизмов; умеренно загрязненными, если содержатся сотни тысяч, и грязными – если миллионы.

Далее определяют содержание в почве кишечной палочки. В санитарно-гигиеническом отношении важно не только зарегистрировать факт наличия кишечной палочки в том или ином субстрате, но и учесть количество данного микроорганизма. Это необходимо для суждения об интенсивности фекального загрязнения. Для этой цели служат два показателя: коли-титр и коли-индекс.

Под титром кишечной палочки понимают наименьшее количество исследуемого материала, в котором обнаруживается одна кишечная палочка. Титр кишечной палочки выражают для жидкостей в миллилитрах или долях миллилитра, для твердых субстратов – в граммах или долях грамма. Коли-индекс – это количество особей кишечной палочки, обнаруженное в определенном объеме исследуемого объекта.

Численность кишечной палочки определяют методом разведений при высеве на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Другим наиболее удобным методом для вычисления коли-индекса является метод мембранных фильтров. Готовят суспензию почвы 1:10 и ее разведения 1:100 и 1:1000 1 мл взвеси вносят в стерильную пробирку с 50 мл воды и фильтруют через мембранные фильтры №2 или №3. Для удаления из взвеси крупных частиц проводят предварительную фильтрацию через фильтр №6. После этого фильтры выкладывают на среду Эндо и инкубируют в течение 24 часов при температуре 37°C. Проводят подсчет выросших колоний кишечной палочки и с учетом разведения делают пересчет на 1 г почвы. После установления коли-индекса определяют коли-титр по формуле:

$$\text{коли-титр} = 1 / \text{коли-индекс}.$$

По коли-индексу судят о чистоте почвы. Чистая почва не содержит ни одной кишечной палочки на 1 г почвы; слабозагрязненная – 10–100; умеренно загрязненная – 100–1000; сильнозагрязненная – более 1000.

Микрофлора воды

Микроорганизмы природных водоемов. Вода рек, прудов, озер, морей и океанов представляет собой естественную среду обитания микроорганизмов, участвующих в процессах круговорота веществ водной среды, активно размножающихся в ней. В воде, помимо минеральных веществ, присутствуют то или иное количество органического вещества. Обычно чем больше в воде

органического вещества, тем больше в ней разнообразных микроорганизмов. Основная масса микроорганизмов попадает в водоемы с почвой, сточными и промышленными водами, пылью, различными органическими остатками и т.д.

Содержание микроорганизмов в водоемах зависит от целого ряда факторов: наличия органического вещества, расположения и степени загрязнения воды, скорости течения, концентрации кислорода, pH, температуры, времени года и др.

Уровень загрязненности водоемов обычно характеризуют *сапробностью*. Сапробность – комплекс особенностей водоема, отличающихся степенью загрязненности органическими веществами и определяющих развитие соответствующих организмов в воде. Различают три типа сапробности.

1. Полисапробная зона – сильно загрязненная, характеризуется большим количеством высокомолекулярных органических соединений, незначительным содержанием кислорода. Преобладают факультативно анаэробные бактерии кишечной группы (*coli-aerogenes*) и анаэробные бактерии, вызывающие гниение и брожение. В 1 мл воды содержится несколько миллионов бактерий. В данной зоне происходит анаэробное разложение (минерализация) растительных и животных остатков, гнилостный распад белков, брожение углеводов и целлюлозы. В результате этих процессов образуется аммиак, сероводород, меркаптаны, метан, органические кислоты, спирты, диоксид углерода и водород.

2. Мезосапробная зона – умеренно загрязненная. В мезосапробной зоне происходит дальнейшая минерализация продуктов распада, но здесь преобладают уже окислительные процессы, при которых продукты анаэробного разложения белков и углеводов, такие как: аммиак, сероводород и другие соединения, окисляются до нитритов и нитратов, серной кислоты и т.д. Количество микроорганизмов в мезосапробной зоне не превышает 100000

в 1 мл воды, численность кишечной палочки здесь существенно ниже. За счет минерализации органических веществ уменьшается количество сапротрофных бактерий. В этой зоне содержатся аммиак и метан.

3. Олигосапробная зона – зона чистой воды, органических веществ нет, окислительные процессы прекращаются. Численность бактерий снижается до 10–100 кл/мл. Бактерии кишечной группы не обнаруживаются. В этой зоне преобладают серобактерии и железобактерии. Последние окисляют закисные соли железа в окисные.

Различают воды атмосферного происхождения – дождевые и снеговые; подземные – ключевые, грунтовые и артезианские; поверхностные воды рек, озер, морей и океанов. В воде атмосферного происхождения очень мало микроорганизмов из-за ее бедности органическими веществами. В подземных водах также обнаруживается незначительное количество микроорганизмов. Практически не содержит микроорганизмов вода артезианских скважин.

Численность и разнообразие микрофлоры поверхностных вод рек, озер, водохранилищ, прудов определяются присутствием в них органических веществ: чем больше органических остатков в воде, тем больше в ней содержится микроорганизмов. В поверхностных водах присутствуют как собственно водные микроорганизмы, так и микроорганизмы, попавшие в воду из воздуха, почвы, с хозяйственно-бытовыми и промышленными сточными водами. На количественный и качественный состав микроорганизмов поверхностных вод оказывают большое влияние и такие факторы, как аэрация, температура, химический состав воды, время года и т.д.

Интенсивность и направленность микробиологических процессов зависят от температуры и содержания в воде молекулярного кислорода. В зависимости от количества кислорода в водоемах выделяют три зоны.

1. Аэробная – поверхностная зона, содержит много кислорода. Ее населяют водоросли и микроорганизмы, осуществляющие процессы минерализации: *Pseudomonas*, *Artrobacter*, миксобактерии. Толщина слоя зависит от количества органики. Если органических веществ мало, то аэробы растут медленно, кислород проходит вглубь и зона увеличивается. Если органики много, то происходит быстрый рост микроорганизмов и кислород не проходит.

2. Анаэробная – содержит мало кислорода. Обитают факультативные и облигатные анаэробы. Нет процесса нитрификации – выделяется аммиак, вода бедна нитратами. Выделяется много метана. Если содержится много сульфатов, то образуется сероводород. Если мало сульфатов, то сероводород образуется за счет расщепления серосодержащих аминокислот. В этой зоне обнаруживаются пурпурные и зеленые серобактерии, сульфатредуцирующие бактерии, можно найти формы, обладающие газовыми вакуолями, такие как *Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Pelodictyon* и *Ancalochloris*, а также передвигающиеся с помощью жгутиков виды *Chromatium* и *Thiospirillum*.

3. Микроаэрофильная – промежуточная между первой и второй. Сверху немного кислорода, снизу – метан, аммиак, окислы металлов. Обитают хемолитоавтотрофы: водород-, метан-, железоокисляющие бактерии. Для зоны также характерна высокая биологическая активность. Здесь развиваются некоторые цианобактерии, способные переносить присутствие сероводорода и отсутствие O_2 , в том числе *Oscillatoria limnetica*. Скорость использования веществ в анаэробных условиях невысока. При этом накапливаются продукты брожения, которые ингибируют последующие процессы разложения органики, и она оседает на дно.

Широко распространены микроорганизмы в прибрежных районах морей и океанов. По мере удаления от берега численность микроорганизмов существенно уменьшается, хотя и в самых удаленных районах морей и океанов они обнаруживаются в больших количествах. Однако в прес-

новодных открытых водоемах микроорганизмов значительно больше, чем в воде морей и океанов.

Известно, что вода играет определенную роль в передаче инфекционных заболеваний. В ней могут находиться возбудители кишечных инфекций, туляремии, лептоспироза, бруцеллеза, инфекционного гепатита, полиомиелита и др. В водоемах постоянно идут процессы самоочищения от болезнетворных микроорганизмов, однако последние могут стать причиной возникновения «водных» эпидемий острых кишечных инфекций – сальмонеллез, дизентерии, холеры. Поэтому определение чистоты воды и предупреждение ее загрязнения – главное мероприятие в профилактике инфекционных заболеваний.

Санитарно-микробиологический анализ воды.

Для санитарно-гигиенической оценки воды определяют следующие показатели:

- общую численность микроорганизмов, выраженную микробным числом, т.е. количеством колоний, выросших на МПА, в чашках Петри при посеве 1 мл неразбавленной воды при температуре 37°C в течение 24 ч.;
- наличие кишечной палочки *Escherichiacoli*: выражается коли-титром, т.е. наименьшим объемом воды, в котором обнаруживается кишечная палочка, и коли-индексом – количеством кишечных палочек в 1 л воды. Согласно существующим нормативам для питьевой воды микробное число не должно превышать 100 клеток бактерий в 1 мл, коли-титр не должен быть менее 300, а коли-индекс – не более 3.

Также учитывается наличие энтерококков в 50 мл воды. При специальном санитарно-микробиологическом исследовании воды наряду с этим учитывают патогенные микроорганизмы: возбудителей дизентерии, брюшного тифа, паратифа А, Б и холеры.

Установление микробного числа проводят методом культивирования или методом фильтрации с использованием мембранных фильтров. Последний является более точным. При определении микробного числа методом культивирования делают посев воды на МПА. Водопроводную воду засевают в количестве 1 мл, из естественных водоемов для засева используют разведения 1:10, 1:100 и 1:1000. Посевы инкубируют при 37°C в течение двух суток, ведут подсчет выросших колоний в чашках и делают пересчет количества микроорганизмов на 1 мл воды.

Вода считается хорошего качества, если число микроорганизмов менее 100 на 1 мл воды, сомнительной – 100–150 микроорганизмов на 1 мл, загрязненной – 150–500 микроорганизмов на 1 мл, грязной – более 500 микроорганизмов на 1 мл воды. Вода, содержащая в 1 мл 100 и более микроорганизмов, считается непригодной для питья.

После установления общего микробного числа определяют бактерии группы кишечной палочки. У нас в стране действуют следующие нормативы для питьевой воды централизованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.1074–01, для питьевой воды нецентрализованного водоснабжения СанПиН 2.1.4.544–

96, согласно которым допускается не более трех кишечных палочек на 1000 мл воды. По международному стандарту вода считается превосходной, когда в 100 мл воды нет ни одной кишечной палочки; удовлетворительной – 1–3 кишечные палочки; сомнительного качества – 4–10 и неудовлетворительного качества – более 10 кишечных палочек.

Кишечные палочки в санитарной микробиологии воды используются в качестве: показателя чистоты; индикатора фекального загрязнения воды; косвенного показателя загрязнения воды патогенными микроорганизмами – возбудителями кишечных инфекций. После обнаружения кишечной палочки в воде определяют энтерококки. В качестве санитарно-показательных используется два вида энтерококков: *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Через мембранный фильтр пропускают 50 мл воды и мембранные фильтры выкладывают на агаризованные диагностические среды. Для обнаружения энтерококков используют среды, содержащие 40% желчи (рН 9,6–10,2) или среды с азидом натрия и азидом калия. На этих средах колонии энтерококков имеют черный цвет. По ГОСТу в питьевой воде не должно содержаться ни одного энтерококка в 50 мл воды.

Микрофлора воздуха

Если в почве и воде микроорганизмы могут не только жить, но и активно размножаться, то воздух – субстрат, неблагоприятный для их развития из-за недостатка в нем питательных веществ, капельно-жидкой влаги и губительного воздействия ультрафиолетовых лучей. В воздух микроорганизмы попадают только вместе с пылью, уносимой с поверхности почвы ветром, и вместе с ней же вновь оседают обратно. Они присутствуют в воздухе в виде так называемого аэрозоля – в очень маленьких твердых частицах либо в капельках жидкости.

Микроорганизмы могут просуществовать в воздухе весьма непродолжительное время: если быстро не осядут на поверхность земли, то погибнут либо под воздействием прямых солнечных лучей, либо в результате обезвоживания. Поэтому микроорганизмы воздуха относительно немногочисленны и случайны. В большинстве случаев их состав зависит от состава микроорганизмов почвы, над которой расположен анализируемый слой воздуха. Попадают микроорганизмы в воздух также с растений и животных, с пылью, разносимой ветром, с атмосферными осадками, особенно туманом; определенную роль играют птицы, насекомые и др.

Численность микроорганизмов в 1 м³ воздуха может колебаться от нескольких клеток до десятков и даже сотен тысяч. Наибольшее количество микроорганизмов находится в слоях воздуха, расположенных над крупными густонаселенными городами, в которых наблюдается интенсивное движение, способствующее подъему большого количества пыли. Существенно снижается численность микроорганизмов в воздухе над сельской местностью,

очень мало их над лесами, горами, морями, океанами и льдами Арктики и Антарктики.

По мере удаления от поверхности земли воздух становится все более и более чистым, даже над крупными населенными пунктами. Согласно исследованиям Е.Н. Мишустина, на высоте 500 м над Москвой в 1 м³ воздуха содержится 2000 – 3000 бактерий, а на высоте 2000 м – всего 500.

Микрофлора воздуха существенно меняется в зависимости от времени года, климатических условий и многих других факторов. Наименьшее количество микроорганизмов содержится в воздухе зимой, наибольшее – летом. Весна и осень занимают среднее положение. Это объясняется тем, что зимой почва покрыта снегом, и воздух не может соприкоснуться с ней и обогащаться микроорганизмами; летом ветер поднимает массу пыли и вместе с ней большое количество микроорганизмов; весной и осенью частые дожди увлажняют почву, и ветер поднимает меньше пыли.

Для микрофлоры воздуха характерно присутствие различных видов спорообразующих бактерий, а также пигментообразующих форм микрококков, сарцин, актиномицетов, дрожжей и плесневых грибов. Считают, что пигменты играют защитную роль при действии ультрафиолетовых лучей на микробную клетку. Болезнетворные микроорганизмы в открытом воздухе практически не обнаруживаются; обычно их выявляют в воздухе закрытых помещений.

Численность микроорганизмов в воздухе закрытого помещения определяется его объемом, частотой проветривания, качеством уборки, степенью освещенности, присутствием людей и др. В 1 м³ воздуха помещений с большим скоплением людей численность микроорганизмов может колебаться от 5000–39000 клеток до нескольких миллионов.

В отличие от открытых мест воздух помещений всегда содержит больше бактерий зимой, чем летом, так как зимой человек проводит большую часть времени в помещении. Особенно много микробов в воздухе закрытых помещений с плохой вентиляцией и освещением. В воздухе таких помещений обнаруживали не только представителей сапротрофной микрофлоры (микро-кокки, сарцины, споры бактерий и грибов и др.), но также ряд патогенных бактерий – туберкулезную палочку *Mycobacterium tuberculosis*, споры палочки сибирской язвы *Bacillus anthracis* и столбняка *Clostridium tetani*, возбудителя газовой гангрены *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, пневмококков *Streptococcus pneumoniae*, стрептококков, стафилококков, вирусы и др. Патогенные микроорганизмы в закрытых помещениях легко переносятся током воздуха. Распространение обусловлено их устойчивостью к высушиванию, что и определяет способность этих микроорганизмов сохраняться в аэро-золях. Вдыхая зараженный воздух, человек и животные могут заболеть.

Воздух может служить источником заражения микроорганизмами пищевых продуктов, различного сырья, технологического оборудования и т.п. Воздух дезинфицируют распылением химических веществ в

парообразном состоянии, например формалина, пропиленгликоля, триэтиленгликоля. Можно использовать также обработку помещений ультрафиолетом.

Санитарно-микробиологический анализ воздуха.

Санитарная оценка воздуха помещения осуществляется по двум микробиологическим показателям: общему количеству бактерий и количеству санитарно-показательных микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Для обнаружения микроорганизмов в воздухе предложено большое количество методов и приборов, позволяющих определять как общее количество, так и состав микрофлоры. В основу методов положены два принципа: оседание (седиментация) и засасывание (аспирация). Простейший – метод Коха, основанный на оседании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Метод Кротова основан на ударно-прибывном действии струи исследуемого воздуха, проводится с помощью прибора Кротова.

Ни один из предложенных методов не позволяет уловить и подсчитать все микроорганизмы, лучше использовать сочетание нескольких методов. Бактериальная загрязненность воздуха определяется по количеству колоний, выросших в чашках Петри на МПА. В.Л. Омелянским установлено, что за 5 минут при спокойном состоянии воздуха на площадь в 100 см² оседает приблизительно столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количество выросших на ней колоний микробов, можно определить количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха.

Критерии чистоты воздуха следующие: в воздухе операционных не допускается присутствие микроорганизмов. Микробное число для пищевых учреждений – не более 500 клеток в 1 м³, для жилых помещений – до 1500 клеток в 1 м³.

Санитарно-показательными микроорганизмами для оценки чистоты воздуха служат гемолитические стрептококки и стафилококки – постоянные обитатели верхних дыхательных путей, слизистой носа и ротовой полости человека. Это *Streptococcus viridans* – зеленящий стрептококк, *Streptococcus haemolyticus* – гемолитический стрептококк и *Staphylococcus aureus* – золотистый стафилококк.

В качестве диагностической среды для их выявления используют кровяной агар. Зеленящий стрептококк имеет вокруг выросших колоний положительную зону неполного просветления с позеленением среды. Гемолитический стрептококк образует на поверхности кровяного агара колонии, окруженные зоной гемолиза.

Воздух считается чистым, если в 1 м³ воздуха содержится летом не более 4 стрептококков, зимой – не более 16. Загрязненным воздух считается, если в 1 м³ воздуха содержится летом более 32 стрептококков, зимой – более

56. Золотистый стафилококк используется в качестве санитарно-показательного микроорганизма в хирургических палатах и родильных домах. В 250 л воздуха не должно содержаться ни одного стафилококка.

Микробиологическое загрязнение биологического сырья

Микроорганизмы в большом количестве содержатся на поверхности плодов, овощей и, вообще, любых пищевых продуктах.

Посев микроорганизмов с поверхности или из внутренних тканей растительного сырья лучше всего проводить на питательные среды, содержащие отвары из соответствующих плодов или овощей, или на универсальные синтетические среды.

К питательным средам, особенно растительного происхождения, рекомендуется добавлять 0,1% танина или фитонциды для подавления неэпифитных почвенных сапротрофных микроорганизмов. Если используют фитонциды, культуры в чашках Петри выращивают в эксикаторе или закрытом сосуде, на дно которых кладут растертую массу (около 50 г) лука, чеснока, хрена, редьки или другого источника фитонцидов. Сверху располагают слегка приоткрытые чашки Петри с посевом. Для контроля в одной чашке Петри на среду Эшби высевают штрихом культуру азотобактера. Если азотобактер образует колонию, то концентрация фитонцидов в воздухе недостаточна и ее следует повысить.

Средняя проба исследуемых плодов или овощей берется следующим образом. Для отбора пробы с поверхности продукта фламбированным скальпелем срезают верхний слой в нескольких местах с нескольких экземпляров, помещают в стерильное часовое стекло известной массы и взвешивают навеску массой 5 г.

Можно использовать метод смыва или соскоба. Смыв с определенной поверхности выполняют стерильным увлажненным водой тампоном, соскоб – металлическим заостренным шпателем, причем снимают тонкий поверхностный слой около 1 мм с площади примерно 1 см². Материал переносят в колбу. Пробы берут с соблюдением строгих условий асептики (стерильная посуда, работа вблизи горелки). Берется определенная площадь поверхностной ткани и смывается в определенном количестве воды.

Навеску массой 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной воды. Колбу взбалтывают круговыми вращательными движениями 10 мин. Из полученной суспензии готовят разведения 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴. Иногда разведения могут быть больше, это зависит от обсемененности исследуемого объекта. Разведения 10⁻⁵, 10⁻⁶ используют для анализа микрофлоры перезревших ягод и плодов с остатками почвенных загрязнений и овощей, выращиваемых в почве, 10⁻³, 10⁻⁴ – для абрикосов, персиков, 10⁻² – для яблок.

Отдельными стерильными пипетками Мора берут по 10 мл суспензии и переносят в колбы, содержащие по 90 мл стерильной водопроводной воды.

Затем из каждой колбы берут по 1 мл суспензии соответствующего разведения в чашки Петри со стерильной питательной средой в трех повторениях. Чашки инкубируют при 30°C.

Через 3–5 дней инкубации подсчитывают общее число колоний, выросших в чашках, и рассчитывают количество микроорганизмов в 1 г. Для этого отбирают для подсчета наиболее подходящее разведение (количество колоний должно быть не менее 50 и не более 100). Подсчитывают все колонии (крупные и мелкие), умножают на степень разведения и определяют количество микроорганизмов в 1 г анализируемого образца. Вычисляют среднее арифметическое на основании подсчета числа колоний в трех чашках.

Для определения качественного состава микрофлоры колонии группируют по культуральным признакам, описывают форму колоний, цвет, поверхность, консистенцию. Из каждой группы колоний готовят препараты, выявляют принадлежность микроорганизмов к определенному роду и устанавливают численность каждой группы в процентах общего количества микроорганизмов.

На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве продукта. Так, на свежих плодах и овощах преобладают дрожжи, образующие блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии; неспороносные бактерии родов *Lactobacillus* и *Acetobacter* (хорошо выявляются на сусло-агаре с мелом и имеют вид чечевицеобразных мелких колоний с зонами растворения мела вокруг) и др. В незначительном количестве встречаются колонии *Erwinia herbicola* оранжевого цвета, блестящие. На свежем доброкачественном зерне этот вид преобладает (до 80%).

Если анализируют несвежие овощи, фрукты или зерно, прежде всего, обнаруживают грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*; микрококки, образующие мелкие белые блестящие плоские непрозрачные колонии; споробразующие палочки, колонии которых обычно в проходящем свете непрозрачны. Встречаются и актиномицеты, образующие плотные кожистые колонии, как бы ввинченные в среду, часто выделяющие пигмент, который особенно хорошо просматривается со стороны дна чашки.

Принадлежность выявленных микроорганизмов к эпифитной микрофлоре можно определить, выяснив их отношение к фитонцидам. Для этого в чашки Петри на агаризованную среду с танином или экстрактом фитонцидов делают посев штрихом заведомо неэпифитного микроорганизма (например, азотобактера), известного эпифита (например, *Erwinia herbicola*) и испытуемой культуры. Если исследуемый микроорганизм эпифит, то вырастают два штриха; контрольный неэпифитный микроорганизм расти не должен.

Практическая работа

1. Определить общее микробное число для воды из водопроводной сети и аквариума.

Для определения количества микроорганизмов в 1 мл аквариумной воды приготовить 10-кратное разведение от 1:10 до 1:1000. Затем 0,1 мл из соответствующего разведения, начиная с большего, внести в стерильные чашки Петри с застывшей агаризованной средой и шпателем равномерно распределить по поверхности. Чашки культивировать в термостате вверх дном при температуре 27–30°C.

Аналогично провести посев микроорганизмов из водопроводной воды. Для этого отобрать пробу воды в стерильную колбу и внести 0,1 мл в чашки с застывшей агаризованной средой.

2. Определить общее микробное число для воздуха в помещении методом Коха.

Разлить расплавленную и остуженную до 45–50°C питательную среду в стерильные чашки Петри. После застывания агара чашку Петри открыть полностью и выдержать в течение 5 минут в исследуемом помещении. Затем чашку закрыть, поместить дном вверх в термостат и культивировать 5–7 дней при 27–30°C.

3. Оценить санитарно-микробиологическое состояние анализируемых объектов.

Определить степень микробиологического загрязнения поверхности любого плода. Выявите долю эпифитной микрофлоры.

Определить степень микробиологического загрязнения различных типов почв.

4. Через 5 дней после посевов для определения общего микробного числа в анализируемом воздухе и пробах воды подсчитать количество выросших колоний на чашках и сделать пересчет на 1 м³ воздуха и 1 мл воды. Оценить степень чистоты воздуха и качество воды по нормативам общего микробного числа.

Определить степень микробиологического загрязнения различных типов почв и плодов.

Провести анализ выросших колоний: подсчитать количество бактерий и грибов, пигментированных бактерий, споровых и неспоровых форм. Приготовить прижизненные препараты из некоторых колоний, промикроскопировать. Ознакомиться с морфологией клеток (форма, подвижность, взаимное расположение), зарисовать. Сделать выводы о степени микробиологического загрязнения анализируемых сред.

Оборудование: Микроскопы, стерильные чашки Петри, колбы на 250 мл с 99 мл стерильной водопроводной воды, пробирки с 9 мл стерильной воды, стерильные пипетки на 1 мл, пробирки, питательные среды, восковые карандаши, часовые стекла, металлические шпатели или ложки, весы и разно-весы, почва, плоды или овощи, лупы, тушь, спички, горелки.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы среды влияют на распространение микроорганизмов в природе?
2. Чем объясняется широкое распространение микроорганизмов в природе?
3. Какова роль микроорганизмов в почве, воде и воздухе?
4. Что представляет собой микрофлора воздуха открытых мест и закрытых помещений? Какие существуют критерии чистоты воздуха?
5. Какие микроорганизмы могут присутствовать в воздухе? Как определить их количество?
6. Какие факторы оказывают влияние на численность микроорганизмов в водоемах?
7. Перечислите показатели санитарно-гигиенической оценки воды.
8. Как проводится санитарно-микробиологический анализ воды?
9. Какие микроорганизмы относятся к санитарно-показательным? Что они характеризуют?
10. Какие показатели характеризуют чистоту водоемов и питьевой воды?
11. Какие факторы оказывают влияние на развитие микроорганизмов в почве?
12. Какие виды загрязнений почвы и воды относятся к наиболее опасным? Как происходит самоочищение почвы и воды?
13. Как можно определить численность микроорганизмов в почве?

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Морфологические признаки.

К ним относят форму бактерий (шаровидные, палочковидные и извитые). У палочковидных отмечают также форму концов клеток (они могут быть вогнутые, закругленные или усеченные). Клетки могут быть одиночные, соединенные попарно, в цепочки, или в виде пакетов.

К морфологическим признакам также относятся размеры клеток в мкм (поперечное сечение, длина палочки, диаметр шаровидных форм); способность к спорообразованию и расположение спор (бациллярное, кластридиальное и плектридиальное); наличие капсул и клеточные включения; способность к движению и тип жгутикования (один жгутик – монотрих, пучок жгутиков на одном конце – лофотрих, по всей поверхности клетки – перитрих). Чаще всего жгутики бывают у палочковидных бактерий, реже – у кокков, коринеподобных бактерий и в единичных случаях у актиномицетов. Важными морфологическими признаками являются окраска по Граму и кислотоустойчивость.

К морфологическим признакам актиномицетов относят тенденцию к образованию ветвящихся гиф, в некоторых семействах развивается и мицелий. Гифы могут быть очень короткими или хорошо развитыми, диаметр их варьирует в пределах 0,5–2,0 мкм, обычно менее 1,0 мкм. Гифы можно наблюдать не всегда, так как в отдельных семействах они легко фрагментируются. Иногда фрагментация гиф ведет к образованию кокковидных, удлиненных или дифтероидных элементов. Для некоторых семейств характерно образование истинных спор на воздушных или субстратных гифах. Споры могут образоваться по одной на гифе, парами или цепочками из разного числа клеток. При большом числе спор формируются цепочки: прямые, в виде петли или спиральные; они могут возникнуть на гифе по одной или в виде мутовок. В отдельных семействах споры в спорангии бывают подвижными или неподвижными в зависимости от рода.

Актиномицеты – грамположительные микроорганизмы, хотя с возрастом культуры окраска по Граму может изменяться. Среди актиномицетов могут быть кислото- и спиртоустойчивые, иногда слабокислотоустойчивые виды.

Почти все представители группы актиномицетов аэробы, за исключением некоторых родов, виды которых могут быть анаэробами или факультативными анаэробами.

Культуральные признаки бактерий.

Характер роста культуры на МПБ и других жидких средах или колоний на МПА и других плотных средах (сусло-агар, агаризованная синтетическая среда) – важные систематические признаки микроорганизмов. В первом случае отмечают: характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая) и ее цвет; наличие мути (слабая, умеренная, сильная);

присутствие, характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный) и его цвет.

К культуральным признакам относятся: форма колонии, профиль колоний, край колонии (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, реснитчатый, ворсистый, ветвистый); поверхность (гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая); размеры (10 мм и более в диаметре – крупная, от 1 до 10 – средняя, не превышают 1 мм – точечная); оптические свойства (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая); цвет (грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т. д.); структура колонии (однородная, мелко- или крупнозернистая, пленчатая, врастающая в агар, легко снимающаяся иглой с агара); консистенция (маслянистая, тестообразная, слизистая, сухая, плотная, врастающая в агар).

При посеве уколом, когда иглу с культурой вводят в столбик агара, отмечают интенсивность роста в верхней, средней или нижней части укола.

При изучении культуральных признаков актиномицетов обращают особое внимание на пигмент и обусловленную им окраску воздушного мицелия и среды. Обычно пользуются специальными пособиями (шкала цветов Бондарцева и другие для определения цвета). Значение имеет консистенция колонии (плотная, кожистая, вросшая в агар, рыхлая), мицелиальный ободок; поверхность колоний (мучнистая, бархатистая) и запах колонии (землистый, эфирный, фруктовый и т. д.).

Определение качественного состава микроорганизмов по культуральным и морфологическим признакам.

Из каждой группы колоний, выросших на плотных средах, готовят препарат и определяют по форме клеток, к какому роду микроорганизмов они относятся. Из общего числа микроорганизмов, развивающихся на МПА, можно выделить следующие роды: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*.

Под Pseudomonas. На МПА образует колонии круглые, неправильной формы, плоские и выпуклые, слизистые и пастообразные, просвечивающие, бесцветные или пигментированные (грязно-белые, синие, сине-зеленые, красные, желтые, бурые и черные).

Характерная особенность представителей этого рода – образование сине-зеленого или желто-зеленого флуоресцирующего пигмента. Некоторые колонии удается наблюдать только в ультрафиолетовых лучах. У других видов пигменты диффундируют в среду, окрашивая ее в соответствующий цвет. Образование определенного пигмента зависит от состава и рН среды.

Клетки *Pseudomonas* прямые или изогнутые, часто с заостренными концами, но не спиральные. Они располагаются одиночно, парами или короткими цепочками, размеры клеток 0,5–1х1,5–4 мкм. Двигутся эти организмы с помощью жгутиков (монотрихи или лофотрихи), не образуют чехлов, для них неизвестны стадии покоя. Чаще всего они – аэробы, но

некоторые в анаэробных условиях могут использовать для дыхания кислород нитратов. Клетки грамотрицательные.

Pod Flavobacterium. Образуют на МПА колонии диаметром 2–3 мм, чаще гладкие, матовые, прозрачные, желтого цвета за счет каротиноидных пигментов, не диффундирующих в среду, встречаются желтовато-оранжевые колонии, иногда и красные.

Клетки палочковидной формы (0,25–0,3x4,0 мкм), слегка искривленные, большинство неподвижные (подвижны только перитрихи), расположены одиночно, иногда парами и в виде коротких цепочек, а иногда в виде нити. Характерен защелкивающийся тип деления (снэппинг-тип обособления делящихся клеток). Эндоспор не образуют. Грамотрицательные.

Pod Micrococcus. Образуют на МПА, как правило, колонии мелких и средних размеров (2–4 мм в диаметре). Колонии могут быть: матовые, блестящие, маслянистые; гладкие, выпуклые, плоские; зернистые, мелко-складчатые, пастообразной или слизистой консистенции, иногда встречаются сухие плотные; цвет колоний может быть белый, серый, реже они бесцветные; встречаются буроватые, желтовато-зеленые, розовые и красные. Пигменты в среду не диффундируют. Клетки мелкие (0,2–1,5 мкм в диаметре), одиночные и соединенные в пары, в ряд или в виде бесформенных скоплений. Клетки неподвижны, не образуют эндоспор. Грамположительные.

Pod Sarcina. Колонии средних размеров; круглые, компактные, выпуклые, плоские, гладкие, бугристые или складчатые, зернистой структуры; матовые или жирно-блестящие; белые, желтые, лимонно-желтые, иногда розовые, красные. Клетки сферические (1,8–3,0 мкм в диаметре) соединены в пакеты из 8 или более клеток.

Pod Mycobacterium. Относится к группе актиномицетов. На МПА растут медленно. Вначале образуют мелкие, круглые компактные колонии, иногда приподнятые, мягкие, пастообразной или слизистой консистенции (растекающие по субстрату), бывают сухие крошащиеся; бугристые складчатые; матовые, блестящие, бесцветные или окрашенные (красные, оранжевые, желтые, зеленые, синие, бурые, черные). Пигмент в среду не выделяют. Молодые клетки ветвистые или угловатые с неправильными контурами

(3,0–7,0x0,7 мкм); с возрастом у большинства видов клетки распадаются на кокковидные и овальные образования. Обособление делящихся клеток происходит по снэппинг-типу. Большинство видов грамположительные.

Pod Bacillus. Палочковидные бактерии, способные образовать более или менее термоустойчивые споры. Во время формирования споры сохраняется палочковидная форма или наблюдается небольшое ее утолщение. По характеру роста колоний на МПА (или МПА+сусло-агар) можно иногда определить видовую принадлежность бацилл. Клетки грамположительные. Аэробы.

Bacillus megaterium – образует колонии гладкие, белые, выпуклые, жирно-блестящие, редко складчатые; края колонии резко очерчены или волнистобахромчатые.

Споры овальные или цилиндрические, не шире материнской клетки, в поперечнике достигают 2 мкм. Длина клеток 5–7 мкм и более.

Bacillus subtilis – сенная палочка. Колонии сухие мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые, срастающиеся с агаром; край колонии волнистый или слегка волнистый. Палочки короткие и тонкие – 3–5x0,9 мкм. Споры овальные 0,9x0,6 мкм, расположены не строго центрально, но на некоторых средах ближе к центру. Клетки подвижные (перитрихи).

Bacillus mesentericus – картофельная палочка. Колонии на МПА тонкие, сухие, морщинистые, серовато-белые, не срастаются с субстратом. Палочки тонкие, длинные и короткие, подвижные (3–10x0,5–0,6 мкм), иногда палочки соединены в длинные нити. Споры овальные и продолговатые (0,9–0,5 мкм). При формировании спор клетки не меняют палочковидной формы. Прорастание спор экваториальное.

Bacillus mycoides – грибовидная палочка. Образует колонии характерные: плоские, ризоидные или мицелиевидные, стелющиеся по поверхности агара. Пучки нитей отходят от края колонии, образуют ложное ветвление; нити изгибаются направо или налево, образуя право- или левовращающиеся формы колоний. Клетки в поперечнике – 0,8–1,2 мкм, по длине в зависимости от среды – 5–7 мкм, но часто 10 мкм и более. Цитоплазма вакуолизирована, с гранулами запасных питательных веществ, формы подвижные (перитрихи). Вид имеет много вариантов. Клетки грамположительные.

Bacillus cereus – колонии толстые, компактные, матовые со складчатым центром и ризоидными волнистыми краями; иногда мелкобугристые, с бахромчатыми краями, от которых отходят тонкие сплетения нитей. Клетки толстые – 1,0–1,5 мкм в поперечнике и 3–5 мкм длины, иногда длиннее; одиночные и соединенные в цепочки, нити. Споры овальные 1,2–1,5x0,9 мкм, расположены субтерминально, прорастают полярно.

Bacillus idiosus – колонии сухие, матовые, плоские, мелкоморщинистые, целиком снимающиеся с поверхности агара. Клетки – тонкие прямые палочки, 2–3x0,6 мкм, подвижные; споры овальные, несколько толще материнских клеток, вследствие чего последние раздуваются при спорообразовании. Чаще споры образуются в центральной части клетки.

Bacillus agglomeratus – колонии на МПА мелкие, белые, плоские, слизистые. Клетки палочковидные 3–6x0,4–0,5 мкм, одиночные и в парах, а иногда соединены в короткие цепочки; подвижные (перитрихи). Споры овальные 0,5 мкм в поперечнике, расположены эксцентральные.

Bacillus virgulus – колонии на агаризованных средах мелкозернистые или волнистые с бахромчатыми краями. Микроорганизм образует длинные нити с частыми перегородками, распадающиеся на отдельные клетки разной длины (4–10x0,7–0,8 мкм). Споры овальные, поперечник их более попе-

речника клетки, поэтому при формировании спор клетки раздуваются, принимают веретенообразную или булавовидную форму. Условный анаэроб.

Bacillus brevis – образует колонии белые, иногда с желтоватым оттенком, гладкие выпуклые или плоские блестящие с зубчатым краем, лучше развиваются на синтетических средах. Клетки размером 3–5х0,7–1 мкм, подвижные (перитрихи), реже соединены в цепочки. Споры овальные 0,8–1 мкм в поперечнике, расположены на концах клеток, раздувают их оболочки. Бывают грамположительными и грамотрицательными.

Bacillus polymyxa – колонии бесцветные плоские или вогнутые, гладкие и слизистые, иногда края колонии имеют пальчатые выросты, рост их на средах умеренный или хороший. Клетки (2,0–7,0х1,0–1,7 мкм) одиночные, парные или в коротких цепочках; подвижные. Споры овальные, продолговатые (2,6х1,7 мкм), расположены в центре. При спорообразовании клетки раздуваются кlostридиально или лимоновидно. Факультативный аэроб.

Под Actinomyces. Лучистые грибки, образуют плотные кожистые колонии различной структуры (гладкие, бугристые, складчатые, бородавчатые с мучнистым налетом). Колонии могут быть разных оттенков, срastaются с субстратом и состоят из несептированных ветвящихся нитей.

Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

При изучении физиолого-биохимических признаков исследуют: отношение к источникам углерода и азота; продукты жизнедеятельности, накапливающиеся в среде (кислоты, спирты, газы), отношение к кислороду, щелочам и различным другим факторам внешней среды.

Среди биохимических свойств культуры особенно важно определение ее ферментативной активности. Активность протеаз устанавливают, во-первых, по разжижению желатина. При этом учитывают скорость, характер разжижения при уколе столбика желатина. Во-вторых, по свертыванию и пептонизации молока, т.е. отмечают кислотность по покраснению синей лакмусовой бумаги, образование устойчивого сгустка и коагуляцию с последующей пептонизацией, пептонизацию без предварительного свертывания, а также скорость происходящих изменений. Активность амилазы определяют по величине зоны гидролиза крахмала, для этого делают пробы с раствором Люголя на 3–4-е сутки после посева культуры на крахмало-аммиачном агаре. Активность целлюлазы устанавливают по степени распада клетчатки на среде Гетчинсона; активность β -фруктофуранозидазы (инвертазы) – по гидролизу сахарозы с помощью реактива Фелинга (щелочной раствор оксида меди), который окисляет альдегидные соединения, при этом оксид меди переходит

в закись – появляется красный осадок; активность уреазы – по накоплению аммиака, используя реактив Несслера; нитратредуктазы – по восстановлению нитрата на среде Гильта до нитрита (нитрит определяют в кислой среде реактивом цинк-йод-крахмал).

Один из важнейших признаков актиномицетов – образование ими антибиотиков. Определенное значение имеет и отношение этих микроорганизмов к источникам углерода, а также продукты их жизнедеятельности.

Изучение продуктов жизнедеятельности.

При использовании микроорганизмами источников углерода, в частности углеводов, продуктами их жизнедеятельности нередко бывают газы, кислоты и спирты. Для обнаружения газов применяют посев уколом в агаровую среду в пробирки – при появлении газов столбик агара разрывается; или используют жидкую среду с перевернутыми вверх дном поплавками. Поплавок – это небольшая узкая пробирка (0,5x3–4 см). Его опускают вверх дном в обычную пробирку с жидкой средой, которая при стерилизации заполняет поплавок. При развитии микроорганизмов, образующих газы, последние вытесняют жидкость из поплавка.

Образование кислот при посеве на средах, содержащих углеводы, устанавливают при помощи индикатора бромтимолблау, а их количество – по титрованию 0,1 н. щелочью. При наличии мела кислоты связываются в виде кальциевых солей, которые можно обнаружить добавлением к 5 мл среды 1 мл концентрированного раствора оксалата аммония. В присутствии кислот (например, уксусной) выпадает белый осадок, нерастворимый в воде.

Образование спирта определяют при отгоне части субстрата с последующей пробой на спирт (реакция на появление йодоформа).

Продуктами жизнедеятельности микроорганизмов на доступных источниках азота часто бывают: аммиак (проба с реактивом Несслера), сероводород и меркаптан (проба с фильтровальной бумагой, смоченной ацетатом свинца), индол (проба с азотистой кислотой), нитрит (проба с цинк-йодкрахмалом в кислой среде). Редуктазную способность культур выявляют обесцвечиванием метиленового синего.

Отношение к кислотам и щелочам.

Для выяснения отношения микроорганизмов к кислотности питательной среды добавляют буферные смеси для поддержания соответствующей реакции среды (рН 3,6–4,0 – цитратно-фосфатный буфер; 4,5–9,2 – фосфатный; выше 9,0 – буферные смеси Na_2CO_3 и HCl в различных соотношениях, а также NaOH и K_2HPO_4). После 8–10 дней инкубации при 28–30°C по росту клеточной массы устанавливают предельные значения рН, при которых еще возможно развитие бактерий. Рост клеточной массы можно определить по оптической плотности на ФЭК.

Отношение к кислороду.

Об отношении микроорганизмов к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в пробирку с агаровой или желатиновой средой. Аэробы развиваются в верхней части укола – рост в виде гвоздя; факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу; анаэробы – в нижней его части.

Устойчивость к факторам внешней среды (температуре, свету, концентрации солей, высушиванию).

Для определения стойкости микроорганизмов к высоким концентрациям солей выращивают культуру на основной питательной среде с добавлением доступного источника углерода и азота и NaCl или Na₂SO₄ в разных концентрациях. После инкубации при температуре 28–30°C по росту клеточной массы устанавливают оптимальные, максимальные и минимальные концентрации солей.

Для выявления устойчивости к температуре культуры на питательной среде (лучше жидкой) помещают в политермостат при разных температурах. Затем по росту клеточной массы выявляют оптимальные, минимальные и максимальные температуры. Аналогично, создавая соответствующие условия, обнаруживают влияние других факторов внешней среды на развитие микроорганизмов.

Отношение к антибиотикам и лизоциму.

Отношение микроорганизмов к антибиотикам можно выявить на агаровых пластинах методами агаровых блоков или штриха. В чашках Петри на агаровую питательную пластину, густо засеянную тест-организмом, помещают агаровые блоки с антибиотиками. Для получения блоков с этими веществами на поверхность питательной среды, предназначенной для выращивания продуцента антибиотиков, высевают сплошным газоном соответствующую культуру.

После того как микроорганизмы разовьются и образуют антибиотические вещества, диффундирующие в толщу агара (бактерии – на 4–5-е сутки, грибы – на 6–8-е; актиномицеты – на 8–10-е), стерильным пробочным сверлом вырезают агаровые блоки. По окончании инкубации в термостате, время которой зависит от скорости роста тест-культуры, вокруг агаровых блоков с антибиотиками возникают зоны, где не наблюдается роста тест-организма. По диаметру зоны судят о его чувствительности к тем или иным антибиотикам.

При использовании метода штриха на питательном агаре в чашках Петри по диаметру высевают культуру продуцента антибиотика. К выросшему организму вплотную подсевают перпендикулярно штрихи тест-культуры. Нечувствительные к антибиотику тест-культуры развиваются от самого края штриха продуцента; чем чувствительнее тест-организм к антибиотику, тем дальше он развивается от штриха. Важный признак продуцента антибиотиков – специфика антагонизма и антимикробный спектр.

Отношение к лизоциму. Лизоцимы – белки-ферменты, широко распространены в мире животных, особенно в слюне и слезах. В концентрации 1 мкг/мл они гидролизуют хитин и его производные, разрушают клеточные оболочки микроорганизмов; особенно эффективно действуют на грамположительные бактерии (*Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Sarcina flava* и др.).

При идентификации бактерии необходимо обязательно дать ее полную характеристику по определителю Берджи и заполнить идентификационную карту.

Схема описания бактерий.

Название микроба _____ . Откуда выделен _____

Время выделения _____ . История _____

Морфология (наблюдения под микроскопом)

(Из перечисленных вариаций признаков выбираются те, которые наиболее соответствуют данному случаю).

Вегетативные клетки: среда, на которой они культивировались
реакция среды _____ , температура _____ ,
возраст культуры _____ дней.

1. *Нормальные формы*: кокки, короткие или длинные палочки, нити, запятые, короткие или длинные спириллы, спирохеты.

Сочетания: одиночные, парами, цепочки, тетрады, гроздевидные, сарцины. Пределы длины: от _____ до _____ , толщина _____

Концы клеток: закругленные, прямосрезанные, вогнутые, заостренные.

Капсулы: наблюдаются _____ , отсутствуют _____ .

Метод окрашивания _____

Подвижность вегетативных клеток: _____ в бульоне, _____
на агаре.

Жгутики: число _____ , расположение: полярное, биполярное,
перетрихиальное (по всей поверхности). Метод окрашивания _____ .

2. *Инволюционные, ненормальные формы*: присутствуют в возрасте _____
_____ при температуре _____ °С, отсутствуют _____ .

Формы их: веретенообразные, клинообразные, нитевидные, ветвистые или _____

Метод окрашивания _____ . Реакция среды _____

3. *Окраска по Граму*: 1 день: + или —, 2 дня, + или —, 3 дня, + или —,
4 дня, + или - _____ день.

Техника, которой пользовались: _____

4. *Специальное окрашивание* _____

Спорангии (спороносные клетки): присутствуют _____
отсутствуют _____

Среда, на которой культивировались _____
реакция _____ , температура _____ °С,
возраст _____ , дней _____ .

1) форма спорангиев: палочки с прямыми сторонами, эллиптические, веретенообразные (*Clostridium*), булавовидные, в виде барабанных палочек (*Plectridium*).

Пределы длины от _____ до _____, толщина _____.

Метод исследования: в окрашенном или неокрашенном препарате. Если окрашенном - то, каким способом _____.

2) расположение спор: центральное, эксцентричное, вблизи концов, или конечное _____.

Форма спор: круглая, эллипсовидная, цилиндрическая _____.

Предельная и средняя величина _____.

Характеристика культур

<p>Штрих на мясо-пептонномагаре.</p> <p>Температура культивирования °С _____</p> <p>Возраст _____ дней.</p>	<p><i>Мощность роста:</i> отсутствует, слабый, умеренный, обильный.</p> <p><i>Общая форма роста:</i> штрих ограниченный, нитевидный, четко-видный, широкий, неограниченный, равномерно затягивающий, ветвистый (корневидный).</p> <p><i>Характер края:</i> гладкий, волнистый, мелкозубчатый, лопастной, волосистый.</p> <p><i>Блеск:</i> влажный, жирный, тусклый; поверхность матовая, мучнистая.</p> <p><i>Характер поверхности (микрорельеф):</i> гладкая, штриховатая, бугроватая, складчатая.</p> <p><i>Профиль (микрорельеф) штриха:</i> пленкообразный, плоский, возвышенный, выпуклый.</p> <p><i>Оптические признаки:</i> opakовый (т. е. не просвечивающий), просвечивающий, опалесцирующий.</p> <p><i>Запах—</i> отсутствует, присутствует, похожий на _____</p> <p><i>Консистенция:</i> маслянистая, тягучая, кожистая, хрупкая, хрящеватая.</p> <p>Цвет посевной черты (пигментация) _____</p> <p><i>Флуоресценция:</i></p> <p><i>Окраска титательной среды:</i> серая, коричневая, красная, синяя, зеленая, не изменилась.</p>
<p>Рост по уколу в мясо-пептонной желатине:</p> <p>Температура культивиро-</p>	<p><i>Распределение роста по длине укола:</i> равномерный, утолщающийся кверху, утолщающийся книзу, гвоздевидный (со шляпкой), только поверхностный.</p>

<p>вания: _____</p> <p>Возраст _____ дней.</p>	<p><i>Форма укола:</i> нитевидная, четковидная, ворсистая, древовидно-разветвленная.</p> <p><i>Разжижение:</i> нет, послыное, кратерообразное, воронковидное, реповидное, мешкообразное, пузырчатое (в глубине).</p> <p>Началось _____ дня. Полное через _____ дней.</p> <p><i>Степень разжижения:</i></p> <p><i>Окраска питательной среды:</i> синяя, красная, зеленая, флуоресцирует, не изменилась.</p> <p><i>Газообразование:</i> нет, питательная среда пронизана пузырьками газа.</p>
<p>Мясо-пептонный бульон.</p> <p>Температура культивирования °С</p> <p>Возраст _____ дней.</p>	<p><i>Поверхностный рост:</i> кольцеобразная пленка, полная пленка, хлопьевидная, сплошная, тонкая, толстая, слизистая, сухая, гладкая, складчатая. Пленки нет.</p> <p><i>Муть:</i> слабая, умеренная, сильная, временное помутнение, постоянное. Помутнения нет. Однородная, зернистая, струйчатая.</p> <p><i>Запах:</i> отсутствует, присутствует, похожий на _____.</p> <p><i>Осадок:</i> плотный, хлопьевидный, зернистый, тягучий при встряхивании.</p> <p><i>Количество осадка:</i> обильный, скудный, нет.</p>
<p>Колонии на мясо-пептонноагаре.</p> <p>Температура культивирования °С</p> <p>Возраст _____ дней.</p>	<p><i>Поверхностные колонии.</i></p> <p><i>Рост:</i> медленный, быстрый.</p> <p><i>Общая форма колоний:</i> затягивающие, крупные (размер), мелкие (размер), точечные (1 мм). Сплошные, волокнистые, хлопьевидные, корневидные. Круглые, неправильной формы.</p> <p><i>Характер края:</i> гладкий, волнистый, лопастный, разорванный, зубчатый, неправильно изрезанный, бахромчатый, ворсистый, нитчатый, локонообразный.</p> <p><i>Поверхность:</i> гладкая, шероховатая, складчатая, бороздчатая. Концентрически или радиально исчерчена. Блестящая, матовая, мучнистая.</p> <p><i>Профиль:</i> пленчатый, плоский, приподнятый, выпуклый, сильно выпуклый (в виде булавочной головки), рогообразный.</p> <p><i>Внутренняя структура</i> (при слабом увеличении микроскопа): однородная, мелко - крупнозернистая, чешуйчатая, неправильно-пятнистая, струйчатая, локонообразная, радиально-концентрически исчерченная.</p> <p><i>Цвет колоний</i> (при наблюдении невооруженным глазом).</p>

	<p><i>Глубинные колонии.</i></p> <p>Форма колоний: в виде чечевичек, лодочек, кусочка ваты, угловатые колонии и т. п.</p>
<p>Колонии на мясо-пептонной желатине.</p> <p>Температура _____ °С.</p> <p>Возраст _____ дней</p>	<p><i>Поверхностные колонии.</i></p> <p><i>Рост:</i> медленный, быстрый.</p> <p><i>Общая форма колоний:</i> крупные (размер), мелкие (размер), точечные (1 мм), круглые, неправильные, мицелиевидные, нитчатые, корневидные.</p> <p><i>Край:</i> гладкий, волнистый, лопастный, разорванный, зубчатый, неправильно изрезанный, бахромчатый, ворсистый, нитчатый, локонообразный.</p> <p><i>Поверхность:</i> гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, концентрически радиально исчерчена. Блестящая, матовая, мучнистая.</p> <p><i>Профиль:</i> пленчатый (иризирующие колонии), плоский, приподнятый, выпуклый, сильно выпуклый (в виде булавочной головки), рогообразный, кратеровидно-углубленный.</p> <p><i>Разжижение:</i> чашевидное, блюдцевидное, кратеровидное, глубокое. Внутренняя структура (при слабом увеличении микроскопа): однородная, мелко-крупно-зернистая, чешуйчатая, неправильно-пятнистая, струйчатая, локонообразная, радиально или концентрически исчерченная.</p> <p><i>Цвет колоний</i> (при наблюдении невооруженным глазом).</p> <p><i>Глубинные колонии.</i></p> <p>Форма колоний: шарообразная, в виде чечевичек лодочек, кусочка ваты, угловатые колонии и т. п.</p>

Физиология

Отношение к температуре.

Оптimum температуры роста _____ °С

Максимум температуры роста _____ °С

Минимум температуры _____ °С

Отношение к реакции питательной среды.

Употребляемая среда _____

Оптimum концентрации водородных ионов (около) _____

Пределы рН для роста от _____ до _____

Образование окраски

Питательная желатина _____

Питательный агар _____

Картофель _____

Молоко (с индикатором или без индикатора)

Температура. _____ °С

Начало свертывания 10 час _____, 12 час _____

14 час _____ час _____, 1-е сутки,

2-е сутки, 4-е сутки, 7-е сутки, _____ сутки, 10-е сутки.

Кислотность в момент свертывания _____ через 7 дней,
через 10 дней

Пептонизация 1-й день _____, 2-й день _____

4-й день _____, 7-й день _____,

10-й день _____.

Молоко с индикатором.

Восстановление лакмуса: началось _____ день,
кончилось _____ день.

Метиленовая синь обесцветилась _____ часов.

Отношение к кислороду.

Метод, которым пользовались _____

Питательная среда _____, температура _____ °С.

Аэробный рост – отсутствует, наблюдается лучше, чем анаэробный.

Анаэробный рост – отсутствует, наблюдается в присутствии декстрозы, сахарозы, лактозы
и нитратов, лучше, чем аэробный рост.

Добавочные данные (особые отличительные признаки) _____

Практическая работа

1. По морфологическим и культуральным признакам и с учетом карты физиологических и биохимических особенностей идентифицировать микроорганизм, чистая культура которого получена от преподавателя.
2. Используя определитель Берджи, подробно описать морфологические и культуральные признаки бактерии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Большой практикум по микробиологии / под ред. Г.Л. Селибера. – М., 1962.
2. Брюханов А., Рыбак К., Нетрусов А. Молекулярная микробиология. – М.: Издательство МГУ, 2012.
3. Васильева З.В. Лабораторные работы по микробиологии / З.В. Васильева, Г.А. Кириллова, А.С. Ласкина. – М., 1979.
4. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие / А.А. Воробьев. – М., 2003.
5. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий = Bacterial Metabolism / пер. с англ.; Г. Готтшалк. – М., 1982.
6. Гусев М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М., 2003.
7. Емцев В.Т. Сельскохозяйственная микробиология: практ. пособие / В.Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – М.: Издательство Юрайт, 2018.
8. Емцев В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, В.К. Шильникова. – М., 1990.
9. Жизнь растений. Т.1. Введение. Бактерии и актиномицеты / под ред. проф. Н.А. Красильникова и проф. А.А. Уранова. – М.: Просвещение, 1974.
10. Жизнь растений. Т.2. Грибы / под ред. проф. М.В. Горленко. – М.: Просвещение, 1976.
11. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин. – М, 2003.
12. Ксенофонов Б. Основы микробиологии и экологической биотехнологии: учебное пособие. – М.: Изд-во Инфра-М, 2015.
13. Куранова Н.Г. Микробиология: учебное пособие / Н.Г. Куранова. – Москва : Прометей, 2017. – Ч. 2. Метаболизм прокариот.
14. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст]: учебник: в 2 т. / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.
15. Микробиология : руководство к лабораторным и пратическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / авт.-сост. Е.В. Скрипникова ; М-во науки и высш. обр. РФ, ФГБОУ ВО «Тамб. гос. ун-т им. Г.Р. Державина». –Электрон. дан. (1 файл). – Тамбов, 2019. – Режим доступа: <https://elibrary.tsutmb.ru/dl/docs/elib559.pdf>. ограниченный.
16. Микробиология: учебник для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальности 060301.65 «Фармация» / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.
17. Микробиология, вирусология и иммунология [Текст]: рук. к лаб. занятиям: учебное пособие / [В.Б. Сбойчаков и др.]; под ред. В.Б. Сбойчакова, М.М. Карапаца. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.
18. Микробиология, вирусология и иммунология: рук. к лаб. занятиям: учебное пособие / под ред. В.Б. Сбойчакова, М.М. Карапаца. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 319 с.

19. Микробиология, вирусология: руководство к практическим занятиям: учебное пособие / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
20. Мудрецова-Висс К., Дедюхина В., Масленникова Е. Основы микро-биологии:учебник. – М.: Изд-во Инфра-М, 2015.
21. Нетрусов А.И. Микробиология: теория и практика в 2 ч. Часть 1: учебник для бакалавриата и магистратуры / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательство Юрайт, 2018.
22. Определитель бактерий Берджи = Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: в 2 т. / подред. Хоулт, Джор Г. – М., 1997.
23. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. – М., 1971.
24. Современная микробиология: Прокариоты: в 2-х т. Т. 1 / пер. с англ.; под ред.: Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М., 2005.
25. Современная пищевая микробиология / Джеймс М. Джей, Мартин Дж. Лесснер, Дэвид А. Гольден; пер. 7-70 англ. изд.– М.: Изд-во Бином. Лаборатория знаний, 2014.
26. Стейниер Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. – М., 1979.
27. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова. – М., 1987.