

Лабораторное занятие 1.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ: УСТРОЙСТВО, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ. МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель занятия: ознакомиться с устройством микробиологической лаборатории, ее оборудованием и реактивами, с методами микробиологических исследований, с техникой безопасности и правилами работы с микроскопом.

Материалы и оборудование: световой микроскоп; рисунки с устройством светового и биологического микроскопа; журнал по технике безопасности; препараты-мазки.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с устройством микробиологической лаборатории (оснащенность оборудованием и реактивами).

Микробиологическая лаборатория и ее оборудование.

Вся работа с микрофлорой проводится в лабораториях, которые в зависимости от основных задач могут быть научно-исследовательскими, диагностическими или производственными.

Современная микробиологическая лаборатория представляет собой комплекс помещений, оборудования и приборов, позволяющих использовать различные приемы для выращивания микроорганизмов, выделения их чистых культур, изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств.

Микробиологическая лаборатория – это рабочие комнаты для проведения исследований и подсобные помещения, которые занимают определенную площадь. Помещения микробиологических лабораторий по степени опасности для персонала разделяются на две зоны:

1) «заразная» зона – помещение или группа помещений лаборатории, где осуществляются манипуляции с патогенными биологическими агентами и их хранение, персонал одет в соответствующий тип защитной одежды;

2) «чистая» зона – помещения, где не проводят работу с биологическим материалом, персонал одет в личную одежду.

В каждой комнате должна быть раковина с водопроводной подводкой и полкой для бутылки с дезинфицирующим раствором.

Микробиологическая лаборатория должна иметь: достаточное количество посуды и других материалов (колбы, пробирки, цилиндры, чашки Петри, пипетки и др.); предметные и покровные стекла; бактериологические петли, пастеровские пипетки; питательные среды; растворы красок для окрашивания препаратов; штативы; газовые горелки; термостаты; анаэростаты, стерилизаторы сухожаровые; стерилизаторы паровые; водяную баню с терморегулятором; холодильники и морозильные камеры; центрифуги (рис. 1.1).

Термостаты используются для культивирования микроорганизмов при стабильной температуре в зависимости от температурного оптимума микробов данного вида.

Анаэростаты используются для культивирования анаэробов. Стерилизаторы сухожаровые (сушильные шкафы, печи Пастера) предназначены для стерилизации металлических, фарфоровых и стеклянных предметов. Режим стерилизации – 160–200 °С.

Стерилизаторы паровые (автоклавы, аппараты Коха) используются для стерилизации пробирок, колб, ватных тампонов, игл и шприцев в герметических упаковках, а также питательных сред и растворов, химический состав которых не изменяется при высоких температурах.

Водяная баня с терморегулятором применяется для дробной стерилизации – тиндализации.



Рис. 1.1. Микробиологическая лаборатория

Холодильники и морозильные камеры служат для хранения исследуемых культур микроорганизмов, питательных сред, патологического и других исследуемых материалов. Для длительного хранения микробов применяют замораживание (при температуре от -20 до -40 °С).

Центрифуги применяются для осаждения микробов в жидкостях: в смывах микробной массы с плотных питательных сред, микроорганизмов, выращенных на жидких питательных средах, и др.

Задание 2. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории, обязанности студентов и дежурных во время работы в лаборатории.

Правила работы в микробиологической лаборатории.

В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов, т. е. популяции микроорганизмов одного вида, часто являющихся потомством одной клетки. В воздухе, на поверхности окружающих нас предметов, на одежде, руках, волосах всегда имеется большое количество разнообразной микрофлоры, поэтому для обеспечения стерильности исследований и предотвращения загрязнения культур работа должна проводиться с соблюдением правил асептики.

1. Запрещается работать в лаборатории без халатов и шапочек, выпускать из-под одежды волосы, воротнички.
2. Запрещается входить в учебные лаборатории в головных уборах и верхней одежде.
3. Запрещается курить, принимать пищу в учебных лабораториях кафедры.
4. Запрещается класть на стол сумки, одежду.
5. Весь материал, с которым предстоит работа, должен рассматриваться как инфицированный.
6. При работе с исследуемым материалом или с культурами микроорганизмов необходимо строго соблюдать следующие технические приемы:
 - ✓ перед работой тщательно проверить целостность стеклянной посуды;
 - ✓ не прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках;
 - ✓ работать только с помощью инструментов (пинцеты, бактериологические петли, иглы, корнцанги и пр.);
 - ✓ при посеве материала сделать надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с указанием номера анализа, культуры и даты посева;
 - ✓ не наклоняться близко над спиртовкой и не протягивать над огнем руки;
 - ✓ не зажигать спиртовку от другой горящей спиртовки, это можно делать только с помощью спичек;
 - ✓ растворы, содержащие микроорганизмы, набирать в пипетку с помощью резиновой

груши; пипетировать ртом и переливать растворы из сосуда в сосуд через край запрещается.

7. О случаях аварии с посудой, содержащей заразный материал, или о пролипании заразного материала необходимо немедленно сообщить преподавателю и вместе с ним провести мероприятия по обеззараживанию загрязненной одежды, частей тела, предметов рабочего места.

Обязанности студентов и дежурных во время работы в лаборатории кафедры.

1. Каждый студент имеет постоянное рабочее место в лаборатории. Из личных вещей на рабочем месте допускается наличие только данного пособия и рабочей тетради, в которой делаются записи и зарисовки. Ничего лишнего (в том числе учебников и других книг) на рабочем столе не должно быть. Сумки, книги, другие личные вещи следует положить в стол.

2. Материал для работы на занятии принимает каждый дежурный по группе у лаборанта кафедры под залог документа (студенческий билет или зачетная книжка), микроскопы выдаются только под залог зачетной книжки.

3. До начала работы необходимо проверить рабочее место, состояние микроскопа, о недостатках сообщить дежурным студентам и преподавателю.

4. Во время занятия дежурный раздает материал под контролем преподавателя. Дежурные принимают учебный материал и распределяют его студентам.

5. Перед началом работы студент обязан надеть медицинский халат. Следует работать аккуратно, экономно расходовать материалы и реактивы, по окончании работы гасить спиртовку.

6. Необходимо во время работы содержать рабочее место в порядке; бережно обращаться с микроскопом и другим оборудованием; при посевах микробов не ходить, не разговаривать; на всех посевах (в пробирках, чашках) делать надписи, содержащие фамилию, курс, группу, дату, объект посева; все использованные пипетки и предметные стекла-мазки опускать в банку с дезинфицирующим раствором, находящуюся на рабочем столе.

Обязанности студентов и дежурных по окончании работы.

1. В конце занятия надо привести в порядок рабочее место. Все предметы на рабочем столе разместить в том порядке, в каком они были до начала работы.

2. Все посевы в чашках и пробирках сдать дежурным (дежурные помещают их в термостат).

3. Отработанный материал (культуры, микробный материал и др.) поместить в бикс для обеззараживания путем автоклавирования.

4. Привести в порядок микроскоп: салфеткой тщательно протереть иммерсионный объектив от масла, перевести револьвер объектива на $\times 8$, подложить под него салфетку, слегка прижав объективом к предметному столику, и, при необходимости, поставить микроскоп на полку или в шкаф.

5. Обработать руки дезинфицирующим раствором и тщательно вымыть их с мылом.

6. Хранение, отпуск, обеззараживание (уничтожение) материалов осуществляется преподавателями и лаборантами согласно соответствующим инструкциям.

7. Сдать лабораторию лаборантам.

Задание 3. Изучить методы лабораторной диагностики, применяемые в микробиологической практике.

Методы исследований, применяемые в микробиологической практике.

Микробиологические методы позволяют определить вид выделенного микроорганизма и осуществить диагностику данного заболевания. При изучении микроорганизмов применяют следующие методы лабораторной диагностики.

1. **Микроскопический.** С помощью этого метода устанавливают морфологические свойства микробов в препаратах-мазках, приготовленных из микробных культур и исследуемого материала: а) форма микроба; б) размер; в) взаимное расположение; г) наличие спор и капсул; д) подвижность.

2. **Бактериологический (микробиологический).** Основан на проведении и посевах микробов на искусственные обычные или специальные питательные среды с целью выделения

чистой культуры и изучения ее свойств.

3. **Биологический (биопроба).** Применяется для определения патогенности, токсикогенности микроорганизмов. Осуществляется путем заражения различными методами чувствительных, лабораторных или других животных.

4. **Серологический.** Основан на обнаружении специфических иммунных тел в сыворотке крови больных животных с помощью стандартных специфических иммунных сывороток, содержащих антитела против определенного вида микробов.

Задание 4. Ознакомиться с правилами работы с микроскопами. Изучить порядок работы светового микроскопа.

Правила работы с микроскопами.

При изучении морфологии микроорганизмов обычно используют световые микроскопы «Биолам Р-12» и «Микромед С-12» (рис. 1.2), биологический микроскоп ХSP-136 (рис. 1.3).



Рис. 1.2. Общий вид световых микроскопов:
а – «Биолам Р-12»; б – «Микромед С-12»

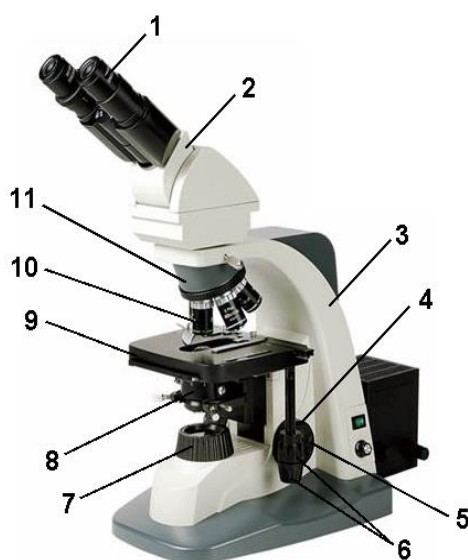


Рис. 1.3. Устройство биологического микроскопа ХSP-136:
1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – штатив; 4 – рукоятка грубой настройки на резкость;
5 – рукоятка точной настройки на резкость; 6 – рукоятки перемещения предметного столика
вправо-влево (вперед-назад); 7 – коллектор; 8 – конденсор; 9 – предметный столик;
10 – объективы; 11 – револьверное устройство

Световой микроскоп – сложный оптический прибор, предназначенный для изучения в

увеличенном изображении мельчайших микроорганизмов, невидимых невооруженным глазом. Световым он называется потому, что изучение объектов осуществляется в проходящем дневном или электрическом свете.

Световой микроскоп состоит из двух частей:

1) механическая часть состоит из подковообразного штатива, состоящего из ножки микроскопа (основание); колонки с прикрепленным к ней предметным столиком; кронштейна конденсора; тубусо- держателя; тубуса; револьвера, в который ввинчиваются объективы; макровинта, который передвигает тубус вверх и вниз; микровинта;

2) оптическая часть содержит объективы, призму, окуляры, осветительное устройство: зеркало, или осветитель (электрическая подсветка), конденсор, диафрагму.

Зеркало служит для направления световых лучей от объекта (микроба) к объективу. Плоская сторона используется при искусственном освещении, вогнутая – при дневном.

Конденсор служит для собирания лучей, идущих от зеркала к одной точке – фокусу; состоит из систем линз. Для яркого освещения при изучении неокрашенных объектов его поднимают вверх, для уменьшения освещенности опускают вниз.

Диафрагма находится под конденсором и состоит из металлических пластинок, которые рычажком раздвигаются и сдвигаются для увеличения или уменьшения доступа света. При сужении пластин световых лучей в объектив попадает мало, при открытии – больше.

Разрешающая способность для современных микроскопов находится в пределах 0,2 мкм и зависит от длины световой волны. Общее увеличение микроскопа – произведение увеличений объектива и окуляра.

Окуляры по своему назначению сравниваются с лупой и увеличивают изображение объектива от 7 до 15 раз. Микроскопы бывают монокулярные (дают плоское изображение) и бинокулярные (изображение объемное, стереоскопическое).

Объективы бывают сухие и иммерсионные. Сухие объективы дают слабое увеличение (в 8–20 раз) из-за большого фокусного расстояния – пространства между фронтальной линзой сухого объектива и препаратом. Иммерсионные объективы позволяют получить увеличение в 40–90 раз благодаря наименьшему фокусному расстоянию между фронтальной линзой и препаратом. При иммерсионном микроскопировании на препарат наносят каплю иммерсионной жидкости (глицерин, вазелин или другие прозрачные масла). При нанесении капли иммерсионного масла не происходит рассеивания лучей света, а значит, хорошо освещается поле зрения. При использовании сухих объективов имеется прослойка воздуха. Световые лучи, проходящие через предметное стекло препарата, попадают в воздушную прослойку, преломляются, отклоняются и не полностью попадают в объектив. Освещенность поля зрения при этом будет незначительная.

Порядок работы со световым микроскопом.

Начало работы:

1. Установить микроскоп на малое увеличение ($\times 4$).
2. Навести максимальную освещенность:
 - а) поворотом зеркала;
 - б) максимальным поднятием вверх конденсора;
 - в) максимальным открытием диафрагмы.
3. Установить микропрепарат на предметный столик и закрепить его зажимами.
4. Найти изображение предмета под $\times 4$.
5. Нанести каплю иммерсионного масла на препарат.
6. Установить микроскоп на большое увеличение ($\times 100$) до щелчка.
7. Под контролем глаза макровинтом опустить объектив микроскопа максимально вниз, пока он не коснется иммерсионного масла.
8. Наблюдая в окуляр, поднимать макровинтом вверх тубус до тех пор, пока не появится изображение предмета.
9. Микровинтом установить более четкое изображение предмета.
10. Провести микроскопию мазка. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

Окончание работы:

1. Поднять вверх тубус макровинтом.
2. Снять микропрепарат.
3. Объектив $\times 100$ отвести в сторону и салфеткой удалить остатки иммерсионного масла.
4. Установить микроскоп в нейтральное положение или на малое увеличение $\times 4$ и опустить тубус вниз.
5. Предметный столик покрыть марлевой салфеткой.
6. Поставить микроскоп в шкаф двумя руками: одной рукой берут за штатив, второй поддерживают за основание.

Темнопольный микроскоп (ультрамикроскоп). Особенностью этого микроскопа является наличие конденсора темного поля (параболоид-конденсора), который концентрирует световой пучок и направляет его на исследуемый объект сбоку. Ввиду того что прямые лучи отсекаются центральной диафрагмой конденсора, а косые лучи, выходящие по периферии диафрагмы, не попадают в объектив, ультрамикроскоп имеет темное поле зрения. При освещении косыми лучами живых и неживых частиц, в том числе микробов, часть отраженных лучей попадает в объектив; при этом наблюдается яркое свечение частиц на темном фоне. Темнопольную микроскопию используют для изучения подвижности микробов, наблюдения очень тонких объектов (спирохет) в препарате «раздавленная капля» (рис. 1.4).

Фазово-контрастный микроскоп. Эта разновидность светового микроскопа позволяет изучать структуру живых неокрашенных микробов (прозрачных объектов). При прохождении света через неокрашенные микробные клетки, в отличие от окрашенных, амплитуда световых волн не меняется, а происходит лишь изменение по фазе, что не улавливается глазом человека. Сдвиг по фазе происходит при прохождении участков с большей оптической плотностью (рибосомы, нуклеоид). Специальные приспособления: фазовый конденсор и объективы с фазовыми кольцами – позволяют преобразовать невидимые фазовые изменения в видимые амплитудные (рис. 1.5).



Рис. 1.4. Общий вид темнопольных микроскопов:
а – микроскоп ВА410; *б* – микроскоп «Levenhuk 950TDARK»



Рис. 1.5. Фазово-контрастные микроскопы: *а* – микроскоп для клинических анализов в ветеринарии «Микромед-3»; *б* – микроскоп «Zeiss Axio Lab.A1»

Люминесцентный микроскоп. Принцип работы этого микроскопа основан на явлении люминесценции. Для получения изображения объектов их обрабатывают флюорохромами, которые при возбуждающем облучении коротковолновой частью спектра светятся цветами с большей длиной волны (зеленым, оранжевым и др.). В люминесцентном микроскопе изучают как живые, так и убитые микробы (с сухой или иммерсионной системами). Люминесцентная микроскопия позволяет получить контрастное цветное изображение, обнаружить малое количество микробов, изучить их структуру и химический состав, использовать метод иммунофлюоресценции (рис. 1.6).



Рис. 1.6. Люминесцентные микроскопы:
а – микроскоп МБС-10; *б* – «Микромед-3 ЛЮМ LED»

Электронный микроскоп. Этот прибор отличается от световых микроскопов значи-

тельно большей разрешающей способностью (около 0,001 мкм) за счет использования вместо света пучка электронов, а вместо стеклянных оптических – электромагнитных линз. В своих наиболее распространенных конфигурациях электронные микроскопы дают изображения с отдельным значением яркости на каждый пиксель, с результатами, как правило, изображенными в оттенках серого. Однако часто эти изображения затем раскрашены посредством использования программного обеспечения или просто ручным редактированием с помощью графического редактора. Это делается обычно для эстетического эффекта или для уточнения структуры и, как правило, не добавляет информации об образце. В электронном микроскопе изучают вирусы, ультраструктуру убитых микроорганизмов (рис. 1.7).



Рис. 1.7. Электронные микроскопы: *а* – микроскоп JEM-F200; *б* – сканирующий электронный микроскоп «FlexSEM 1000 Hitachi HT»

Контрольные вопросы

1. Каково назначение микробиологической лаборатории?
2. В чем состоят основные правила работы в микробиологической лаборатории?
3. Основные правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории.
4. Устройство светового микроскопа и правила работы с иммерсионной системой.
5. Перечислите основные методы микробиологических исследований.
6. Кем сконструирован первый в мире микроскоп и впервые замечены микроорганизмы?
7. Классифицируйте микроскоп, находящийся в лаборатории.

Лабораторное занятие 2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель занятия: изучить морфологические особенности бактериальной клетки; освоить микроскопический метод исследований микроорганизмов; провести микроскопию и зарисовать окрашенные в мазках микроорганизмы.

Материалы и оборудование: микроскопы; таблицы с рисунками микроорганизмов, строения бактериальной клетки; оборудованное рабочее место для бактериологического исследования, укомплектованное всем необходимым.

Ход занятия

Задание 1. Изучить строение бактериальной клетки и морфологические особенности микроорганизмов.

Строение бактериальной клетки.

Существует огромное разнообразие форм бактериальных клеток, которые могут невероятно сильно отличаться друг от друга. Однако некоторое количество сходных черт есть у всех бактерий.

Бактериальная клетка обычно устроена наиболее просто по сравнению с клетками других живых организмов. Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ.

Бактериальные клетки часто окружает капсула, которая служит защитой от внешней среды. Для многих свободноживущих бактерий характерно наличие жгутиков для передвижения, а также ворсинок.

Клеточная стенка бактерий обычно содержит пептидогликан. По химическому составу клеточные мембраны бактерий гораздо разнообразнее мембран эукариотических клеток.

Как и любая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной, вместе с ядерным аппаратом они относятся к **обязательным органоидам**. Цитоплазма и цитоплазматическая мембрана составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К **необязательным (второстепенным) структурным элементам** относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки и т. д.

Общая схема строения бактериальной клетки показана на рис. 2.1.

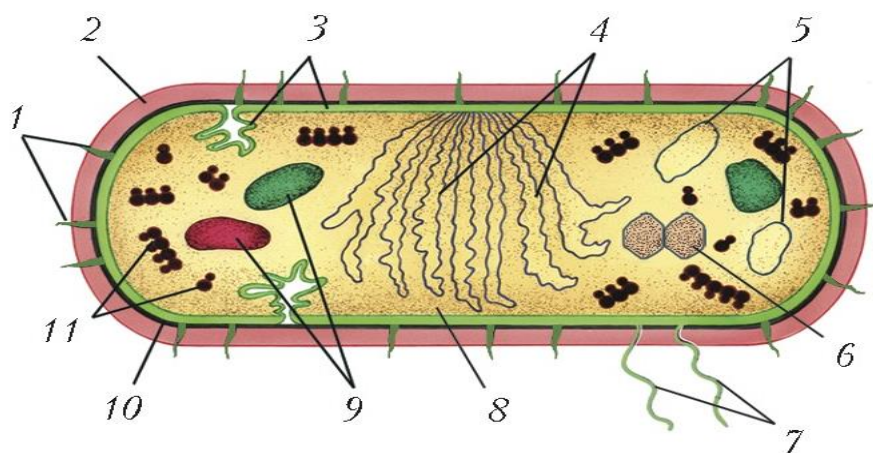


Рис. 2.1. Схема строения бактериальной клетки (по Г. Шлегелю):
1 – пили; 2 – слизистая капсула; 3 – цитоплазматическая мембрана; 4 – геномная ДНК (нуклеоид);
5 – плазмиды; 6 – карбоксисомы; 7 – жгутики; 8 – цитоплазма; 9 – включения запасных веществ;
10 – клеточная стенка; 11 – рибосомы

Клеточная стенка присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других, не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего, обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий. В составе клеточной стенки – два основных слоя, из которых наружный более пластичный, внутренний – ригидный.

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие **функции**:

- ✓ обеспечивает механическую защиту клетки от воздействий факторов окружающей среды;
- ✓ обеспечивает поддержание формы бактериальной клетки;
- ✓ дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах;
- ✓ осуществляет транспорт веществ и ионов (характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану, которая является дополнительным барьером для их поступления; основным барьером служит цитоплазматическая мембрана);
- ✓ препятствует проникновению в клетку токсичных веществ (также более характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану);
- ✓ в клеточной стенке находятся антигены (липополисахариды у грамотрицательных бактерий и тейховые кислоты у грамположительных бактерий);
- ✓ на клеточной стенке находятся рецепторы, ответственные за взаимодействие клеток донора и реципиента при конъюгации бактерий.

Основное химическое соединение клеточной стенки, которое специфично только для бактерий, – **пептидогликан** (муреиновые кислоты). От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий – отношение к окраске по Граму. В соответствии с ним выделяют две большие группы – грамположительные и грамотрицательные бактерии. Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с **генциановым фиолетовым** (окрашены в **сине-фиолетовый цвет**), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и **окрашены в розовый цвет** за счет докрасивания **фуксином**.

Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий. Мощная, толстая, несложно организованная клеточная стенка, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, отсутствуют липополисахариды (ЛПС), часто – диаминопимелиновые кислоты.

Особенности клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Клеточная стенка значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, содержит ЛПС, липопротейны, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно – имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций: барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные системы – дыхательные, окислительно-восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

Цитоплазма – сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (внеклеточная ДНК), мезосомы (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

Рибосомы – рибонуклеиднопротеиновые частицы цитоплазмы, количество которых в одной клетке достигает нескольких тысяч. Форма округлая или овальная, размер 20–25 нм. Располагаются одиночно или группами по 10–20 рибосом (полирибосома). Они представлены двумя субъединицами: большой и малой. Рибосомы являются местом биосинтеза белка в клетке.

Мезосомы, или митохондрии, образуются в результате инвагинации и последующего ущемления цитоплазматической мембраны. Являются энергетическими центрами клетки. С помощью ферментов в них происходит окисление жирных кислот, окислительное фосфорилирование, т. е. то, что называют процессами дыхания.

В центре бактериальной клетки находится *нуклеоид* (генофор) – ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Ядерное вещество прокариотической клетки, в отличие от ядер эукариотов, не имеет ядерной мембраны. Состоит из нуклеопротеидов двухцепочечной нити ДНК. Принимает участие в передаче наследственных признаков клетки. Без нуклеоида клетка нежизнеспособна.

Эндоспоры и спорообразование. *Спорообразование* – способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. *Эндоспоры* образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью (*резистентностью*) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных факторов окружающей среды. При световой микроскопии часто используют метод выявления спор *по Ожешко*. Высокая резистентность связана с большим содержанием *кальциевой соли дипиколиновой кислоты* в оболочке спор. Расположение и размеры спор у различных микроорганизмов отличаются, что имеет дифференциально-диагностическое (таксономическое) значение. Основные фазы жизненного цикла спор – *споруляция* (включает подготовительную стадию, стадию предспоры, образования оболочки, созревания и покоя) и *прорастание*, заканчивающееся образованием вегетативной формы. Процесс спорообразования генетически обусловлен.

Некультивируемые формы бактерий. У многих видов грамотрицательных бактерий, не образующих спор, существует особое приспособительное состояние – некультивируемые формы. Они обладают низкой метаболической активностью и активно не размножаются, т. е. не образуют колоний на плотных питательных средах, при посевах не выявляются. Обладают высокой устойчивостью и могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких лет. Некультивируемые формы не выявляются классическими бактериологическими методами, обнаруживаются только с помощью генетических методов (*полимеразной цепной реакции – ПЦР*).

К *поверхностным структурам бактерий* (необязательным, как и клеточная стенка) относятся **капсула, жгутики, микроворсинки**.

Капсула, или слизистый слой, окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют *микрочапсулу*, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, и *макрочапсулу*, обнаруживаемую при световой микроскопии. Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов – фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций – распознавание и поглощение.

У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов – чаще в организме хозяина. Существует ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава. Капсула чаще состоит из полисахаридов (наиболее распространенная окраска – *по Гинсу*), реже – из полипептидов.

Жгутики – органы передвижения у микробов. Они представляют собой тонкие спиральные нити, превышающие по длине размеры клетки. Жгутик представляет собой цилиндр. В нем различают филамент (тело жгутика), крюк и базальное тело. Филамент жгутика состоит из белка флагеллина. Химическая структура его строго специфична для каждого штамма, что дает возможность использовать антигенные свойства жгутиков при классификации микроорганизмов.

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий (рис. 2.2):

- 1) **монотрихи** имеют один полярный жгутик;
- 2) **лофотрихи** – полярно расположенный пучок жгутиков;
- 3) **амфитрихи** – жгутики по диаметрально противоположным полюсам;
- 4) **перитрихи** – жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у

бактерий генетически детерминирована.

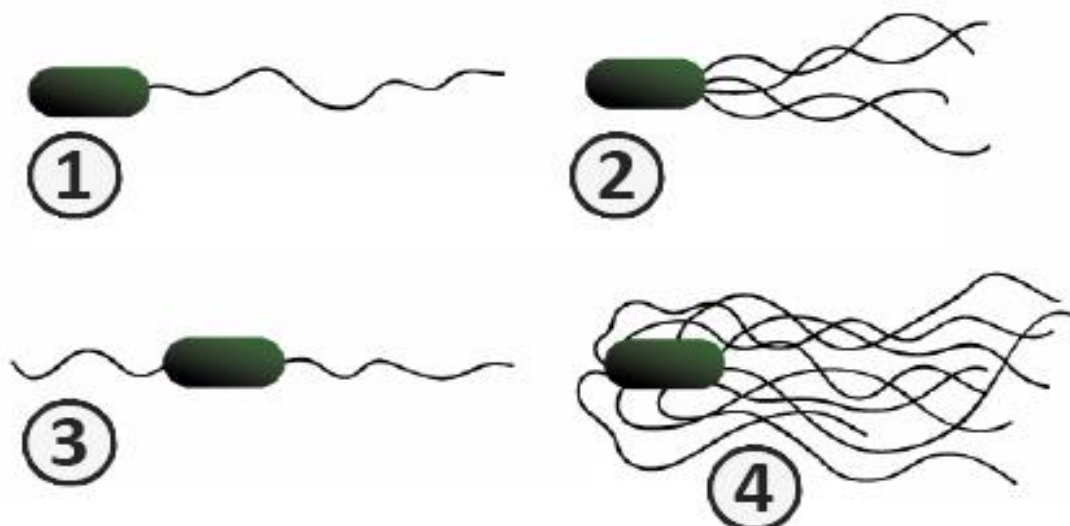


Рис. 2.2. Типы жгутикования у бактерий: 1 – монотрихи; 2 – лофотрихи; 3 – амфитрихи; 4 – перитрихи

Ворсинки (фимбрии, пили) – более мелкие, нитевидные образования на поверхности микробных клеток. По форме напоминают цилиндр. Ворсинки состоят из специального белка пилина, могут сокращаться, притягивать к поверхности донорские фаги или реципиентные клетки. Через некоторые из них передается генетический материал от клетки донора к клетке реципиента.

Задание 2. Изучить основные принципы классификации микроорганизмов. Ознакомиться с морфологическими признаками бактерий.

Принципы классификации микроорганизмов.

Мир микроорганизмов велик и разнообразен. Методы исследования этих существ пока еще не всегда совершенны. Поэтому при классификации микроорганизмов встречается много трудностей, а полученные данные иногда бывают противоречивы. Несмотря на это, исследователи все время делают попытки объединить сходные организмы в определенные группы. С накоплением новых данных систематика совершенствуется.

К микроорганизмам относят: бактерии; вирусы; грибы; простейшие; микроводоросли.

Общим признаком микроорганизмов являются их микроскопические размеры; отличаются они строением, происхождением и физиологией.

Бактерии – одноклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишённые хлорофилла и не имеющие ядра.

Грибы – одноклеточные и многоклеточные микроорганизмы растительного происхождения, лишённые хлорофилла, но имеющие черты животной клетки, эукариоты.

Вирусы – это уникальные микроорганизмы, не имеющие клеточной структурной организации.

Простейшие – микроорганизмы, состоящие из одной клетки. В отличие от бактерий и вирусов, у простейших есть одно или несколько ядер.

Микроводоросли – виды одноклеточных водорослевых организмов.

Большинство бактерий являются одноклеточными, разнообразными по форме, размерам и обмену веществ. При дифференциации бактерий путем микроскопии учитывают размеры и формы клеток, их взаимное расположение, химический состав и строение клеточных стенок, способность образовывать споры и капсулы, подвижность.

Разнообразие форм бактериальных клеток невелико. Основные формы бактерий – это шары (кокки), палочки (прямые, изогнутые или извитые), тороиды и звезды (рис. 2.3).

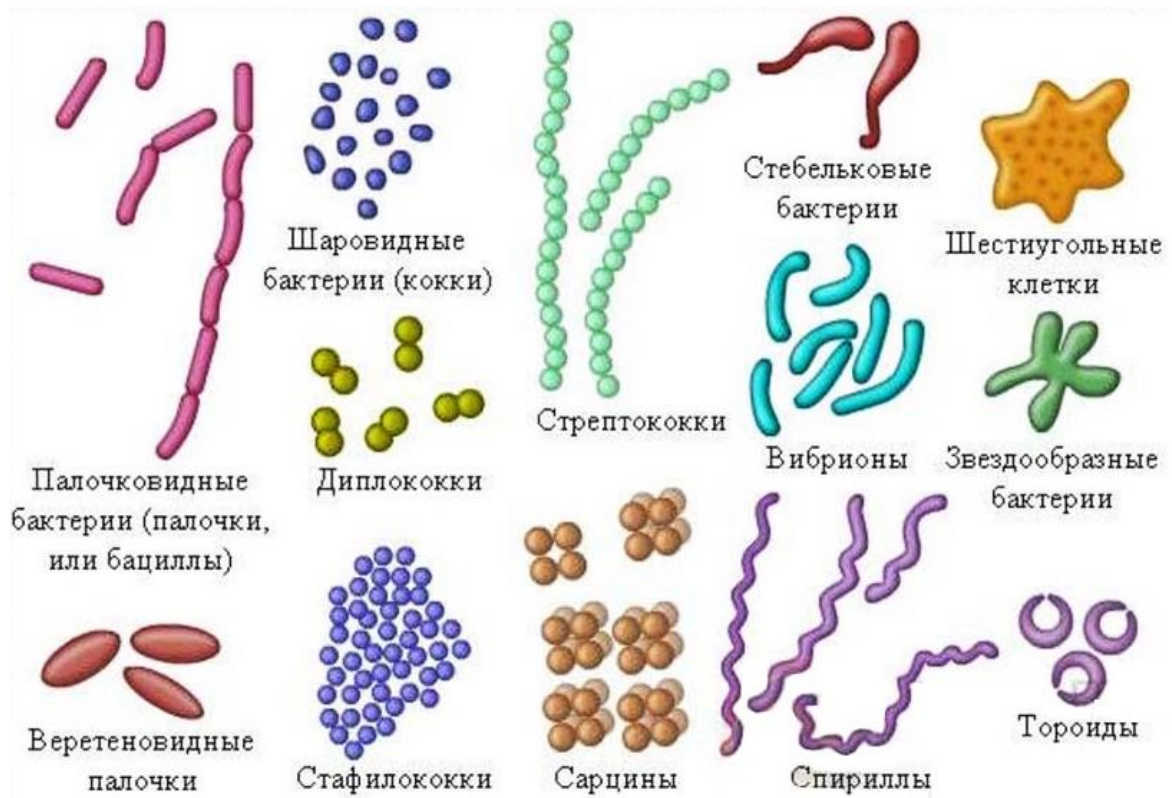


Рис. 2.3. Основные формы бактериальных клеток

По морфологии микроорганизмы бывают шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии – микробы по форме напоминают шар, но бывают овальные, плоские, односторонне вогнутые или слегка вытянутые.

Кокковые микробы (рис. 2.4) делятся на следующие группы:

- микрококки – в природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток. В качестве примера можно привести клетки *Micrococcus agilis*;
- диплококки – шаровидные бактерии, расположенные попарно. Они образуются при делении кокков в одной плоскости;
- стафилококки – располагаются беспорядочно, скопления кокков чаще напоминают гроздь винограда;
- стрептококки – образуются делением кокков в одной плоскости, клетки располагаются цепочкой. С этими бактериями знакомятся при изучении молочнокислого брожения на примере *Streptococcus lactis*;
- тетракокки – кокки, расположенные по четыре клетки. Такое расположение клеток – результат деления материнских форм в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;
- сарцины – по форме напоминают пакеты или тюки. Образуются вследствие деления кокков в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

Кокковидные микроорганизмы



Рис. 2.4. Шаровидные формы бактерий

Все вышеуказанные формы бактерий грамположительные, за редким исключением неподвижные. Диаметральный размер их – 0,7–0,8 мкм.

К *палочковидным бактериям* относят бактерии и бациллы. Бактерии спор не образуют, а бациллы образуют споры (рис. 2.5). Бактерии и бациллы бывают разные по форме и размерам. У мелких бактерий разница между длиной и шириной невелика, по внешнему виду они напоминают кокки. Истинные палочковидные бактерии имеют длину до 4 мкм. Бациллы могут иметь длину до 20 мкм и более, несколько толще истинных бактерий. Размножаются поперечным делением, реже поперечным.

Палочковидные микроорганизмы

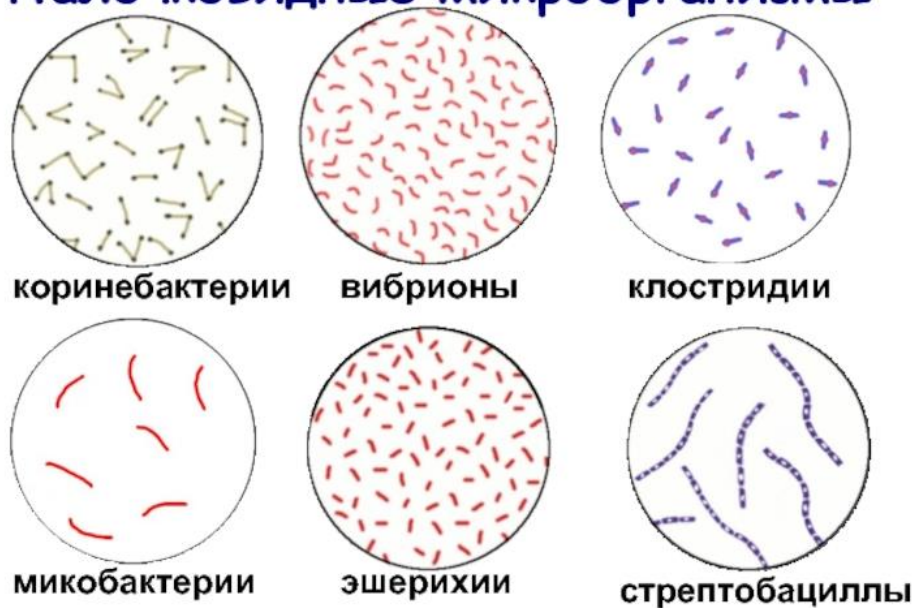


Рис. 2.5. Палочковидные формы бактерий

В настоящее время палочковидные микробы, образующие споры, представлены бациллами и клостридиями. У клостридий, в отличие от бацилл, поперечник спор превышает диаметр поперечного сечения вегетативной клетки, что придает им форму веретена. Среди них встречаются азотфиксаторы, возбудители анаэробных инфекций и других процессов в природе.

Извитые формы микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков. К извитым бактериям относят вибрионы, спираиллы и спирохеты (рис. 2.6). Вибрионы имеют цилиндрическую изогнутую форму, напоминающую запятую.

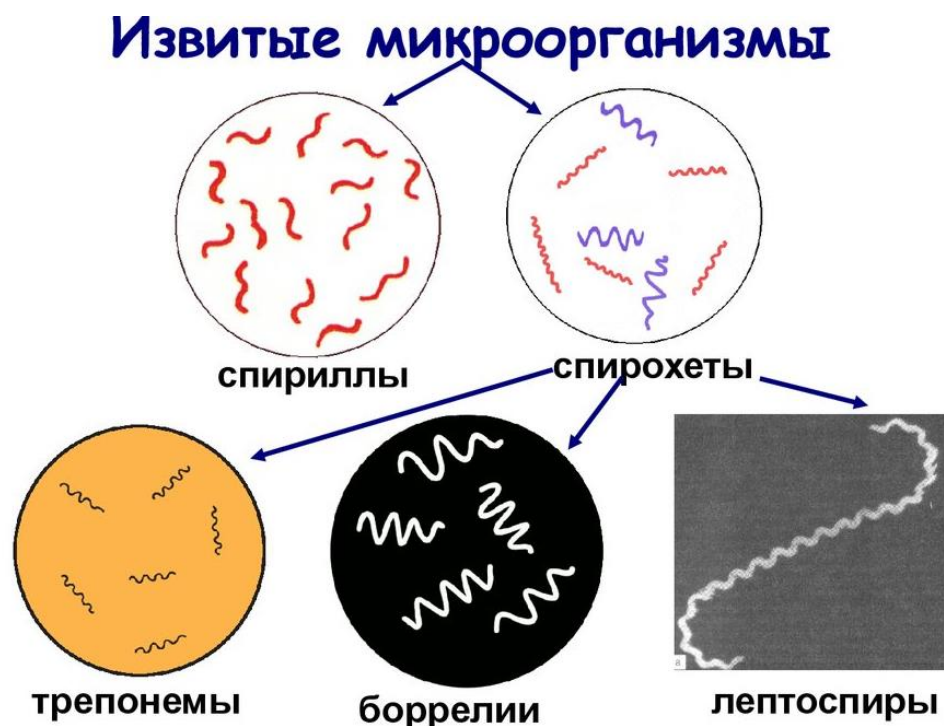


Рис. 2.6. Извитые формы бактерий

Спираиллы – извитые формы бактерий, образующие до 3–5 завитков.

Спирохеты – тонкие длинные извитые формы со множеством завитков. Они занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими.

Задание 3. Ознакомиться с сущностью и этапами микроскопического метода диагностики.

Микроскопический метод диагностики.

Микроскопический метод исследования – это метод обнаружения и определения микроорганизмов в исследуемом материале на основании:

- ✓ морфологии микробной клетки;
- ✓ специфического расположения микробных клеток в мазке;
- ✓ наличия специфических (необязательных) органоидов в микробной клетке;
- ✓ тинкториальных свойств микробной клетки (отношение к красителям).

1-й этап – приготовление препарата.

На середину чистого обезжиренного предметного стекла стерильной петлей наносят небольшую каплю воды. В нее вносят исследуемый материал. Полученную суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла тонким слоем таким образом, чтобы препарат распределился на площади примерно 2–3 см².

Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе.

Производят фиксацию мазка. Для этого стекло с высохшим мазком проводят 3–4 раза

над пламенем горелки той стороной, на которой мазок отсутствует.

Цель фиксации:

- умертвить клетки микроорганизмов и сделать их безопасными (что особенно важно при работе с патогенными микроорганизма-ми);
- зафиксировать (закрепить) мазок на стекле (чтобы клетки микроорганизмов не смывались при окрашивании);
- улучшить окрашивание, поскольку мертвые клетки лучше адсорбируют на своей поверхности различные красители.

Помимо термической обработки, применяют также фиксацию химическими веществами.

2-й этап – окрашивание препарата.

В зависимости от цели исследования мазок окрашивается разными методами:

- *простые* (определение формы микроорганизмов, расположения их в мазке) (рис. 2.7, 2.8);

- *сложные* (выявление отдельных клеточных структур микроорганизмов).

3-й этап – микроскопия препарата.

4-й этап – заключение по результатам исследования.

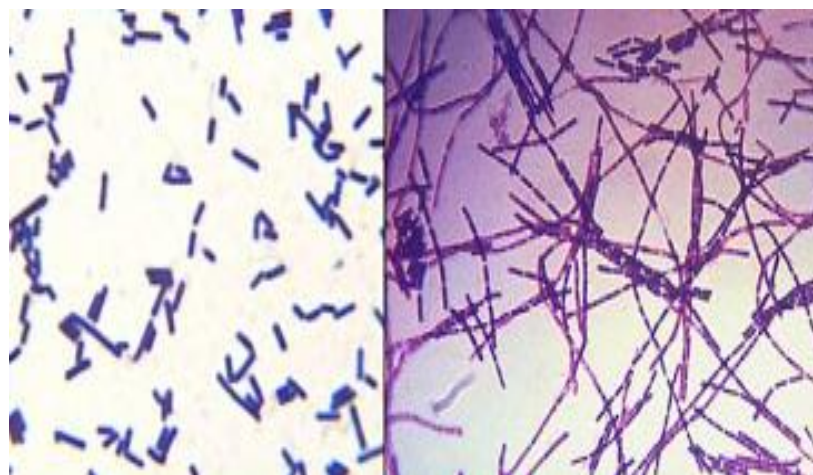


Рис. 2.7. Окраска палочковидных бактерий простым методом (окраска генцианвиолетом)



Рис. 2.8. Окраска палочковидных бактерий простым методом (окраска фуксином Циля)

Контрольные вопросы

1. Строение бактериальной клетки и морфологические особенности микроорганизмов.

2. Постоянные структурные компоненты бактериальной клетки (нуклеоид, мезосомы, рибосомы, ЦПМ).
3. Какие функции выполняет клеточная стенка бактерий?
4. Какие основные формы бактерий выделяют по расположению и количеству жгутиков?
5. Основные принципы классификации микроорганизмов.
6. Морфологические признаки бактерий.
7. Какие имеются формы микробов?
8. Назовите основные признаки, используемые при идентификации микроорганизмов.
9. Особенности структуры и разнообразие шаровидных бактерий.
10. Морфология и структура палочковидных неспорообразующих бактерий.
11. Основные этапы микроскопического метода исследований.
12. Простой метод окраски микроорганизмов.
13. В чем состоит принцип и диагностическое значение простого метода окраски бактерий?
14. В чем заключается техника фиксации мазка и его значение?
15. Тинкториальные свойства микробной клетки (отношение к красителям).
16. Методы окрашивания препаратов-мазков.

Лабораторное занятие 3. ОСНОВНЫЕ КРАСИТЕЛИ И КРАСЯЩИЕ РАСТВОРЫ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ-МАЗКОВ ПРОСТЫМИ МЕТОДАМИ ОКРАСКИ

Цель занятия: отработать технику приготовления и окраски препаратов-мазков простым методом из микробных культур; провести микроскопию и зарисовать окрашенные в мазках микроорганизмы.

Материалы и оборудование: пробирки с культурами; набор красок и реактивов для окрашивания мазков; пинцеты анатомические, стерильные ватные тампоны на спичке; оборудованное рабочее место для бактериологического исследования, укомплектованное всем необходимым.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с основными и кислыми красителями, применяемыми для окраски бактериологических препаратов.

Красителями для окраски бактериологических препаратов.

Красители, применяемые для бактериологических исследований, относятся к группе так называемых анилиновых. Они подразделяются на *основные* и *кислые*. Основными красками хорошо окрашиваются ядерный хроматин и микробы. Кислые краски окрашивают микробы слабее, при окраске же тканей они окрашивают протоплазму клеток.

Из основных красителей наиболее часто применяются: нейтральный красный – сафранин, фуксин (красные); генцианвиолет, метилвиолет, кристаллвиолет (фиолетовые); везувин (коричневый); метиленовый синий, малахитовый зеленый (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Основные красители, применяемые в бактериологической практике

Из кислых красителей широкое применение находят: кислый фуксин, эозин (красные); Конго, пикриновая кислота (желтые); нигрозин (черный). Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, предложенной А. И. Синевым.

Все эти краски продаются в виде аморфных или кристаллических порошков, из которых готовят красящие растворы.

Приготовление красящих растворов.

Исходным материалом почти для всех необходимых рабочих красок являются насыщенные спиртовые растворы, которые следует иметь в запасе и сохранять в склянках с притертыми пробками. Насыщенные спиртовые растворы готовят следующим образом: 10 г сухой краски насыпают во флакон с притертой пробкой, наливают 100 мл 96%-ного спирта (ректификата) и дают настояться в течение нескольких дней, каждый день взбалтывая раствор. Из таких насыщенных растворов готовят спиртово-водные растворы, пригодные для окраски микробов. Наиболее часто употребляются следующие растворы:

- *карболовый фуксин* (фуксин Циля) – состоит из 10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина и 90 мл 5%-ной карболовой кислоты;
- *разведенный фуксин* – состоит из 10 мл карболового фуксина и 90 мл дистиллированной воды;
- *щелочной метиленовый синий* – состоит из 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего, 100 мл дистиллированной воды и 1 мл 1%-ного раствора щелочи;
- *карболовый генцианвиолет* – состоит из 10 мл насыщенного спиртового раствора генцианвиолета и 90 мл 5%-ной карболовой кислоты.

Растворы генцианвиолета дают осадок при окрашивании. Вместо генцианвиолета можно пользоваться насыщенными спиртовыми растворами метиленвиолета или кристаллвиолета. Растворы карболовой кислоты можно брать 1%-ные, а не 5%-ные. Кроме того, для окраски по Граму можно пользоваться 0,25%-ным водным раствором метиленвиолета или кристаллвиолета без карболовой кислоты. Раствор стоек и осадка не дает.

По методу Синева вместо раствора генцианвиолета применяют кусочки фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной спиртовым раствором краски и затем высушенные. Для этого листы фильтровальной бумаги погружают на 1–2 мин в 1–2%-ный раствор краски в 96%-ном спирте, бумагу высушивают и разрезают на кусочки величиной 2×4 см. Такие бумажки сохраняются в банках с притертой пробкой неограниченное время.

Различают простые и сложные методы окраски. При простом методе *прокрашивается вся клетка*, при сложном – *определенные клеточные структуры*. Простой метод окраски позволяет быстро определить форму микроорганизмов, размеры, расположение микроорганизмов в мазке. Для этого применяют один краситель. Чаще всего пользуются фуксином или метиленовым синим.

Задание 2. Изучить методику простых методов окрашивания. Приготовить препараты-мазки из исследуемых культур микроорганизмов, высушить, зафиксировать и

окрасить генциановым фиолетовым (по методу Синева).

Характеристика простых методов окраски.

Особенности методов: одноэтапность, окраска одним красителем.

Назначение методов: изучение формы, взаимного расположения микробов в мазке, размеров клетки.

Техника приготовления мазков. При приготовлении мазка с плотной питательной среды на обезжиренное предметное стекло наносят петлей небольшую каплю физиологического раствора. В правую руку берут бактериологическую петлю, в левую – пробирку с культурой. Петлю стерилизуют, внося ее в пламя горелки в вертикальном положении.

После того как петля накалится докрасна, через пламя горелки проводят конец петледержателя. Затем вынимают пробку из пробирки, захватив ее мизинцем правой руки или зажав между мизинцем и безымянными пальцами, и обжигают на спиртовке край пробирки. Петлю вносят в пробирку, охлаждают ее, прикасаясь к стенкам, после чего с поверхности среды снимают небольшое количество культуры. После этого петлю вынимают, не касаясь стенок пробирки, обжигают края пробирки над спиртовкой и закрывают пробкой.

Захваченную микробную культуру вносят в каплю физиологического раствора, нанесенную ранее на предметное стекло, тщательно размешивают и равномерно распределяют по стеклу в виде овала, круга или квадрата площадью 1–1,5 см², отступив от краев стекла не менее 3–5 мм (рис. 3.2). По окончании приготовления мазка петлю вновь стерилизуют, после высушивания границы мазка обводят восковым карандашом с обратной стороны стекла и записывают шифр препарата.



Рис. 3.2. Внесение микробной культуры в каплю физиологического раствора

При изготовлении мазка из культур с жидких питательных сред на предметное стекло наносят 1–3 петли исследуемого материала и равномерно распределяют по нему; при этом использование физиологического раствора не требуется. Далее поступают так же, как описано выше. Для приготовления препаратов используют бактериологические петли и пастеровские пипетки.

Высушивание мазка производят на воздухе, над пламенем горелки (но не в пламени), в потоке теплого воздуха и в термостате (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Высушивание мазка над пламенем горелки

Фиксация мазков. Различают *физический* и *химический* методы фиксации мазков. При фиксации физическим методом стекло с мазком, обращенным кверху, медленно проводят 3–4 раза через пламя. При этом микроорганизмы погибают, мазок прикрепляется к стеклу и не смывается.

При фиксации мазков химическими веществами предметное стекло с мазком погружают в мензурку с 96%-ным этанолом на 15–20 мин, с ацетоном – на 5 мин, со смесью 96%-ного этанола и 40%-ного формалина (соотношение 95:5) – на 2 мин, с хлорформом – на несколько секунд и др. (рис. 3.4).

Приготовление фиксированных препаратов из естественных мест обитания микроорганизмов проводится так же, как и из чистых культур.



Рис. 3.4. Фиксация препаратов-мазков химическим методом

Техника окрашивания. На приготовленный и фиксированный мазок, помещенный на специально предназначенный для этих целей мостик, который расположен над ванночкой и состоит из двух стеклянных палочек, находящихся на расстоянии $\frac{2}{3}$ длины предметного стекла друг от друга и скрепленных между собой резиновыми трубочками, наносят какой-либо краситель (рис. 3.5): растворы метиленового голубого – на 3–5 мин, генцианового фиолетового – на 2–3 мин, фуксина основного – на 2–3 мин.

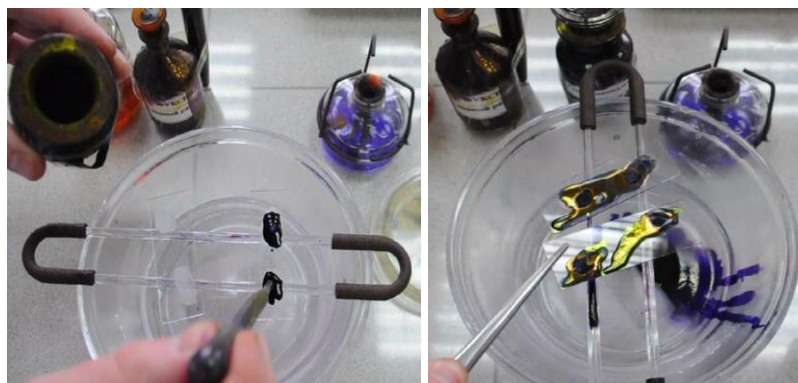


Рис. 3.5. Окраска приготовленных препаратов-мазков красящими веществами

Затем тщательно и быстро промывают водой (рис. 3.6), высушивают фильтровальной бумагой, наносят каплю иммерсионного масла, микроскопируют. Мазок считается качественным, если бактерии расположены изолированно друг от друга и равномерно окрашены.



Рис. 3.6. Тщательное и быстрое промывание препарата-мазка водой

Приготовленные препараты микроскопируют в иммерсионной системе. Определяют морфологию микроорганизмов. Микроскопическую картину зарисовывают в тетради.

Контрольные вопросы

1. Краски и красящие растворы для окрашивания мазков.
2. Простой метод окраски микроорганизмов.
3. Техника приготовления фиксированного мазка.
4. Техника окрашивания препаратов-мазков красителями.

Лабораторное занятие 4. СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Цель занятия: ознакомиться с морфологическим разнообразием бактерий и основными признаками; изучить основные признаки и назначение сложных методов окраски микробов по методам Циля – Нильсена, Ожешко, Бурри – Гинса, Леффлера и Нейссера; освоить технику окраски по методу Грама.

Материалы и оборудование: рабочее место для бактериологического исследования, укомплектованное всем необходимым (лоток с рельсами для предметных стекол, дистил-

лированная вода, бактериологические петли, предметные стекла, газовая горелка, фильтровальная бумага, набор красок и микроскоп); памятки поэтапного окрашивания микробов по Граму, с указанием последовательности и продолжительности окраски мазков красящими растворами; пробирки и чашки Петри с исследуемыми образцами культур микроорганизмов.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с назначением и характеристикой сложных методов окрашивания. Изучить сущность окраски по методам Циля – Нильсена, Ожешко, Бурри – Гинса, Леффлера и Нейссера.

Сложные методы окраски (их еще называют дифференциальными) основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для изучения структуры клетки, также для дифференциации микроорганизмов на основе их тинкториальных свойств.

При сложных методах окрашивания мазок подвергается воздействию двух красок, из которых одна – *основная*, а вторая – *дополнительная*. Кроме красящих веществ при сложных методах окрашивания применяют различные обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты, щелочи и др.

Сложные методы окраски позволяют кроме морфологии (форм, размера, взаимного расположения микроорганизмов) более детально изучить структуру и различные элементы микробной клетки (споры, капсулы, жгутики, наличие или отсутствие зернистости, bipolarности и т. д.); определить тинкториальные свойства (различное окрашивание при использовании специальных методов).

Среди всего разнообразия микроорганизмов существуют такие, которые обладают выраженной устойчивостью к неорганическим кислотам, спиртам и щелочам. Это связано с тем, что в их клеточной стенке и цитоплазме содержится сравнительно большое количество липидов, воска и миколовой кислоты.

Характеристика сложных методов окраски.

Особенности методов: многоэтапность; окраска двумя красителями; протравители, дифференцирующие вещества.

Назначение методов:

- дифференцирование одних видов микробов от других: метод Грама, метод Циля – Нильсена, метод Романовского – Гимзы;

- изучение структуры микробной клетки: метод Ожешко (споры), метод Бурри – Гинса (капсула), методы Леффлера и Нейссера (включения), метод Леффлера (жгутики).

Основным способом выявления кислотоустойчивых микроорганизмов является окраска по методу Циля – Нильсена. Именно этот способ применяют для обнаружения микобактерий туберкулеза в мокроте больных людей.

Окраска по Цилю – Нильсену. Для окрашивания кислотоустойчивых бактерий вместо обычных красителей применяют концентрированные растворы красителей с подогревом, например, карболовый фуксин Циля, который окрашивает все микроорганизмы в рубиново-красный цвет. При последующей кратковременной обработке кислотой одни микробные клетки прочно удерживают краситель и не обесцвечиваются в растворе кислот, другие – теряют цвет. Это позволяет кислотоустойчивые микроорганизмы отличить от микроорганизмов, не обладающих этим свойством. Затем при дальнейшем докрасивании красителем другого цвета (например, метиленовой синью) не кислотоустойчивые микроорганизмы приобретают цвет дополнительного красителя (рис. 4.1), а кислотоустойчивые микроорганизмы сохраняют цвет основного красителя (фуксина Циля).

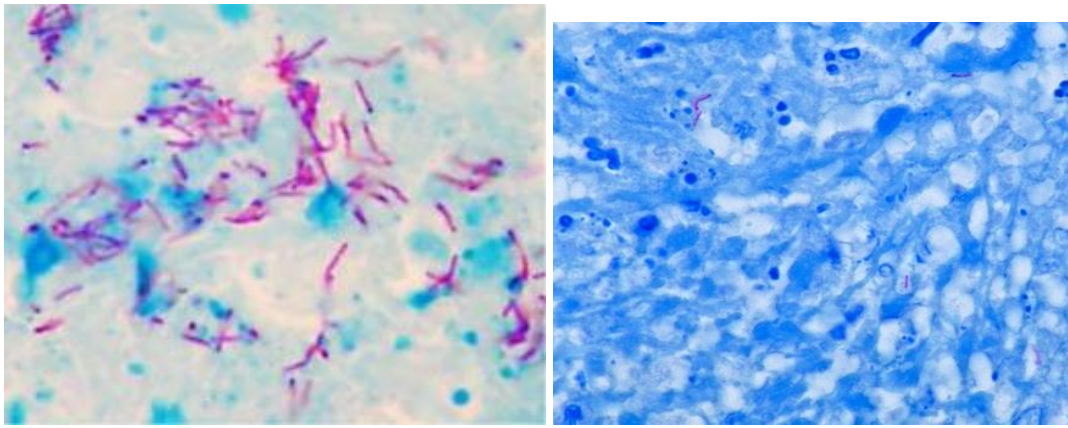
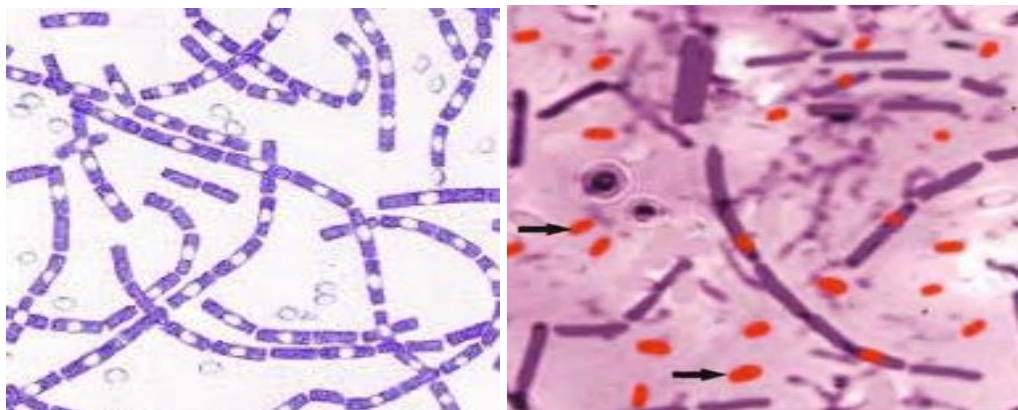


Рис. 4.1. Окраска кислото-щелоче-спиртоустойчивых микроорганизмов по Цилю – Нильсену: возбудитель туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) окрашивается в красный цвет, фон препарата – голубой

В препарате, окрашенном по методу Циля – Нильсена, кислотоустойчивые микроорганизмы имеют рубиново-красный цвет, не кислотоустойчивые микроорганизмы, лейкоциты, элементы ткани – голубой цвет.

Наличие спор у микроорганизмов можно обнаружить с помощью окраски по методу Ожешко (рис. 4.2).



a

б

Рис. 4.2. Окраска микроорганизмов по Ожешко: *a* – бациллы сибирской язвы (*Bacillus anthracis*); *б* – споры окрашиваются в красный цвет, фон препарата – фиолетовый

Окраска по Ожешко. Споры по сравнению с вегетативной клеткой обладают устойчивостью к факторам окружающей среды. Они являются кислотоустойчивыми и с трудом воспринимают красители. Объясняется это наличием плотной оболочки, небольшой концентрацией свободной воды, высоким содержанием липидов. В препаратах, окрашенных простым способом или по Граму, споры остаются бесцветными. Поэтому для окраски спор пользуются специальными методами с применением протравителей (кислоты, щелочи). Протравители разрыхляют оболочку споры, облегчая проникновение в нее красителя. Далее действуют по такому же принципу, как для окраски кислотоустойчивых микроорганизмов: препарат окрашивают концентрированным красителем (например, карболовым фуксином Циля) с подогревом, а затем обесцвечивают кислотой и докрасивают в какой-нибудь контрастный цвет (например, метиленовым синим).

По методу Ожешко споры окрашиваются в красный цвет, вегетативные клетки – в голубой.

Наличие капсулы у микроорганизмов можно определить, окрасив препарат по методу Бурри – Гинса.

Окраска по Бурри – Гинсу. В силу своего химического строения капсулы при обычных методах окраски остаются бесцветными. Для их обнаружения применяют негативную окраску. Все представленные ранее методы относятся к позитивным, так как при их использовании окрашиваются микробные клетки. При негативных же способах краситель заполняет пространство вокруг бактерий (для этого можно использовать черную плакатную тушь, которая не проникает в микробную клетку, а следовательно, не окрашивает ее). Далее докрашивается красителем (например, фуксином) микробное тело. В результате капсула будет контрастировать на темном фоне препарата и микробной клетки. При окрашивании по методу Бурри – Гинса на темном фоне препарата контрастно выделяются неокрашенные капсулы, внутри которых находятся бактерии ярко-малинового цвета.

В цитоплазме некоторых бактерий могут образовываться отложения гранул (зерен) волютина, гликогена, гранулезы, капелек жира, кристаллов оксалатов, жидкой серы, скопленных пигмента. Зерна волютина содержат значительное количество метафосфатов и других соединений фосфора. Эти зерна хорошо обнаруживаются, например, у дифтерийной палочки, что является важным дифференциально-диагностическим признаком возбудителя дифтерии.

Для обнаружения зерен волютина чаще всего пользуются методами окраски по Леффлеру и Нейссеру.

Окраска по Леффлеру. Зерна волютина по своему составу отличаются от цитоплазмы. При простой окраске (например, щелочным метиленовым синим) зерна волютина выявляются в виде более темных участков цитоплазмы, т. е. гранулы окрашиваются более интенсивно, чем цитоплазма (явление метахромазии).

По методу Леффлера цитоплазма микробных клеток окрашивается в голубой цвет, гранулы волютина – в синий.

Окраска по Нейссеру. В силу того, что зерна волютина отличаются от цитоплазмы по химическому составу, при сложной окраске они адсорбируют иные красители, чем цитоплазма, и поэтому окрашиваются в другой цвет.

По методу Нейссера тела бактерий окрашиваются в нежный светло-коричневый цвет, зерна волютина – в темно-синий, почти черный.

Задание 2. Освоить методику окраски препаратов-мазков по Граму. Окрасить и микроскопировать исследуемые образцы микроорганизмов. Изучить их морфологию и зарисовать.

Отношение микробов к окрашиванию по Граму является важным дифференциальным признаком, который в сочетании с другими позволяет отличить один микроб от другого. Метод был предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом. При окрашивании по этому методу все микроорганизмы подразделяются на грамположительные и грамотрицательные, что зависит от химического состава и строения клеточной стенки. Толщина клеточной стенки грамположительных микроорганизмов находится в пределах 2–60 нм, плотно прилегает к цитоплазме, мембране и состоит на 40–90 % из пептидогликана, или муреина. Клеточная стенка грамположительных бактерий в 3 раза тоньше (10–20 нм), многослойна, содержит до 5–10 % пептидогликана.

Неодинаковое отношение различных микробов к красителям трифенилметановой группы (генцианвиолету, метилвиолету, кристаллвиолету) является особенностью окрашивания по методу Грама. Группа **граммотрицательных** микробов дает прочное соединение с указанными выше красителями и йодом. Окрашенные микробы не обесцвечиваются под действием спирта, вследствие чего при продолжительной окраске фуксином грамотрицательные микробы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет. **Грамположи-**

тельные микроорганизмы образуют с этими красителями и йодом непрочное, легко разрушающееся под действием спирта соединение, в результате чего они обесцвечиваются и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет. Это объясняется тем, что проницаемость клеточной стенки у грамположительных бактерий меньше, чем у грамотрицательных, из-за большого содержания пептидогликана и меньшего диаметра пор, что способствует удержанию образующегося комплекса при обработке бактерий этанолом, у грамотрицательных бактерий – наоборот (рис. 4.3–4.7).

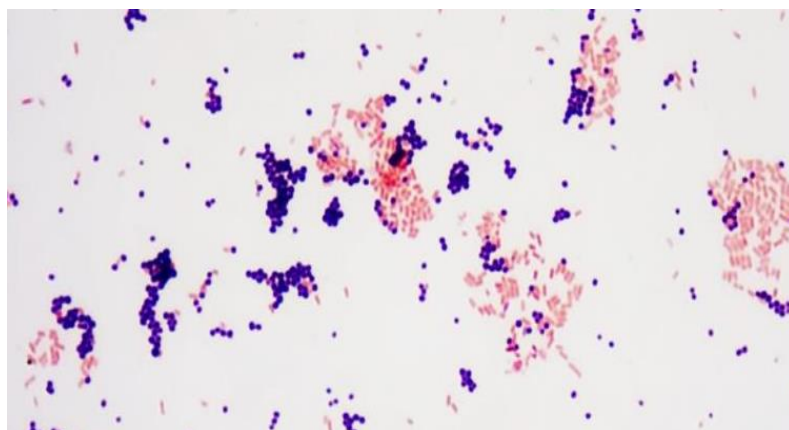


Рис. 4.3. Окраска по Граму *Staphylococcus aureus* (грамположительные кокки) и *Escherichia coli* (граммотрицательные бациллы)

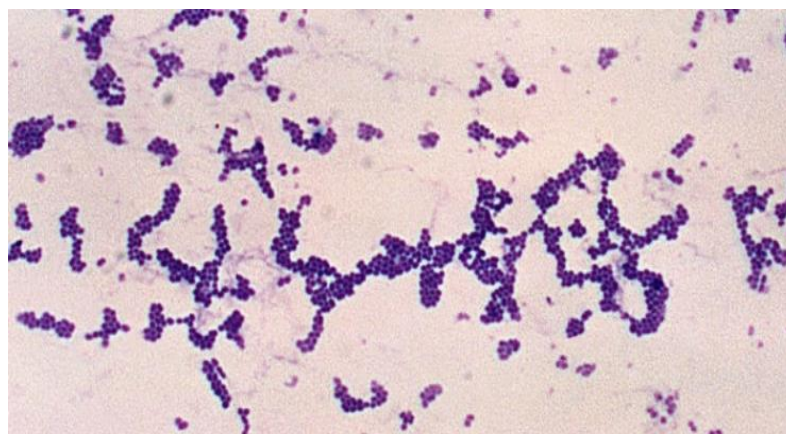


Рис. 4.4. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) – грамположительен

При содержании в мазке бактерий различных видов можно обнаружить как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии.

В свою очередь, актиномицеты являются грамположительными ветвящимися формами бактерий, которые образуют ветвящиеся гифы, некоторые из них формируют мицелий субстратный и воздушный (рис. 4.5).

Свое название они получили от первого из описанных видов – *Actinomyces bovis* – «лучистого грибка», который вызывает болезнь крупного рогатого скота актиномикоз.

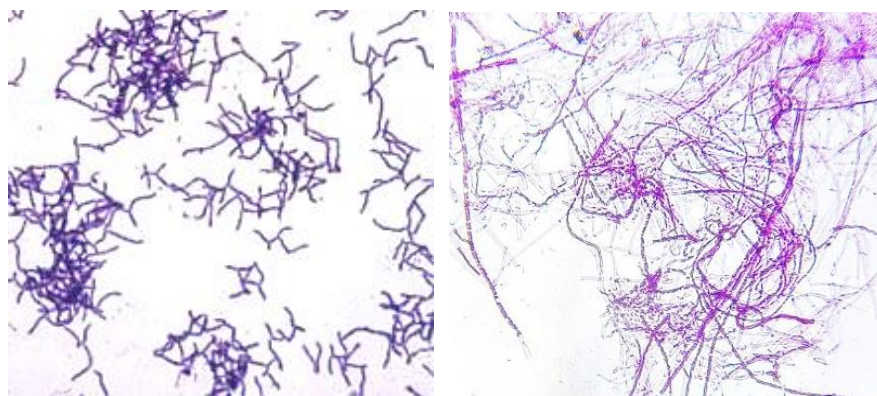


Рис. 4.5. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): актиномицет (*Actinomycetes*) – грамположительен



Рис. 4.6. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательна

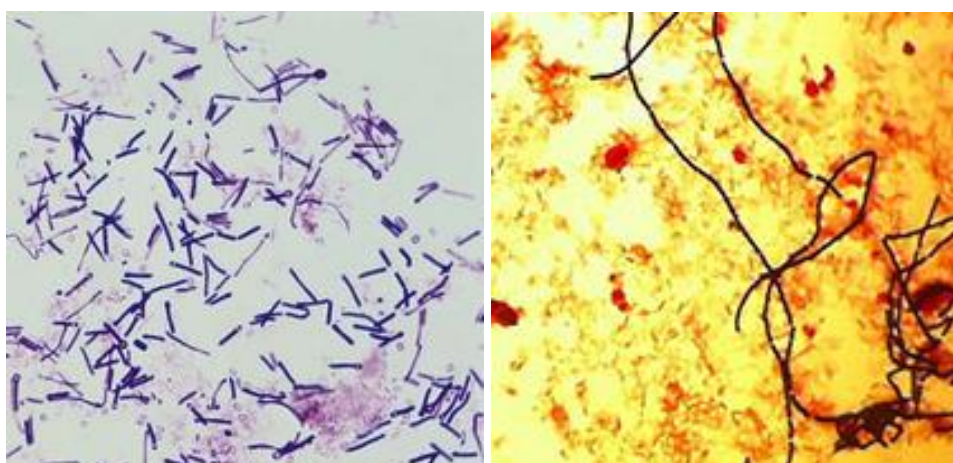


Рис. 4.7. Окраска бактерий сложным методом (окраска по Граму): *Clostridium perfringens* – молодые микробные клетки грамположительны, старые микробные клетки грамотрицательны

Окрашивание по Граму проводится следующим образом:

1. На высушенный и фиксированный в пламени горелки мазок кладут **окрашенную бумажку (по методу Синева)** размером 2×3 см. На ее поверхность наносят несколько капель

(3–5) дистиллированной воды и выдерживают в течение 2 мин. В течение всего времени прокрашивания бумага должна оставаться влажной и плотно прилегать к поверхности стекла. При подсыхании бумагу дополнительно смачивают водой. 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.

2. Затем удаляют полоску фильтровальной бумаги пинцетом, краску сливают и, не смывая водой, наливают на мазок **раствор Люголя** на 1–2 мин.

3. Далее раствор Люголя сливают и обесцвечивают мазок спиртом-ректификатом в течение 20–30 с.

4. Быстро и тщательно промывают мазок водой.

5. Окрашивают дополнительно **фуксином Пфейффера** (или разведенным сафранином, нейтральротом или везувином) в течение 2–3 мин.

6. Затем краску смывают водой, а мазок высушивают чистой фильтровальной бумагой и микроскопируют (рис. 4.8).



Рис. 4.8. Сложный метод окраски по Граму

Мазок после обсушивания фильтровальной бумагой должен быть совершенно сухим, в противном случае при соприкосновении оставшейся влаги с кедровым (иммерсионным) маслом образуется эмульсия и при микроскопии получится неясное изображение.

Микроскопическая картина: при правильной окраске мазков по Граму грамположительные микробы будут окрашены в темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в цвет дополнительной краски (например, в розовый цвет фуксина Пфейффера).

Грамположительно окрашиваются стафилококки, дрожжи, стрептококки, возбудитель сибирской язвы, почвенно-гнилостные споровые палочки (например, сенная, капустная, картофельная, корневидная и др.), возбудитель рожи свиней, клостридии, возбудитель туберкулеза и др.

Грамотрицательно окрашиваются все представители энтеробактерий (сальмонеллы, кишечная палочка, протей и др.), возбудители бруцеллеза, пастереллеза, некробактериоза, туляремии, синегнойная палочка, минингококки, уксуснокислые бактерии.

Результаты окрашивания по Граму грамположительных и грамотрицательных бактерий, представлены на рис. 4.9.

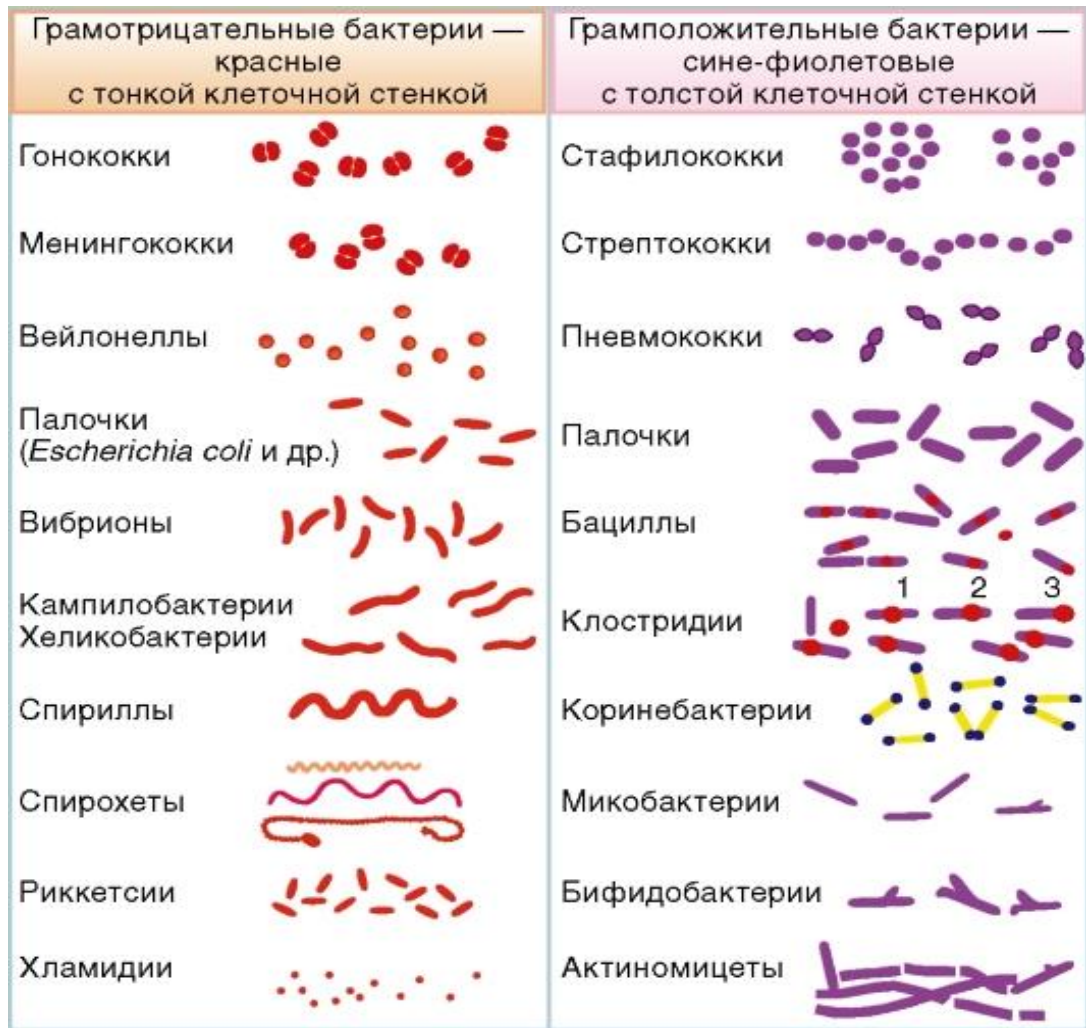


Рис. 4.9. Результаты окрашивания сложным методом по Граму

Задание 3. Изучить методику окрашивания спор, капсул и включений (гликоген, гранулеза, зерна волютина) микробных клеток.

Окрашивание спор.

Споры окрашиваются сложным методом, поскольку они имеют плотную оболочку. Перед окрашиванием изменяют прозрачность оболочки спор путем воздействия на нее протравителями (хромовой, соляной кислотами) или раствором фенола при подогревании. Оболочка при этом размягчается, увеличивается порозность. Краситель хорошо адсорбируется, споры не обесцвечиваются при кратковременном воздействии кислотой. Вегетативные же тела микробных клеток при действии кислотой обесцвечиваются и становятся видимыми только при дополнительном окрашивании контрастным красителем.

Техника окрашивания (метод Златогорова). Мазок фиксируют над пламенем горелки. На его поверхность кладут фильтровальную бумагу величиной с покровное стекло, окрашенную фуксином основным феноловым Циля. Бумагу смачивают 3–5 каплями воды. Окрашивание проводят при подогревании в течение 5–7 мин. Чтобы мазок не высыхал, во время испарения жидкости к нему (по каплям) добавляют воду. Затем мазок обесцвечивают 3%-ным раствором серной кислоты в течение 5–10 с и промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят метиленовым голубым до 2–3 мин, после чего мазок промывают водой и высушивают.

В поле зрения микроскопа видно, что споры окрашены в красный цвет, а вегетативные

клетки – в синий.

Окрашивание спор по Пешкову. После фиксации над пламенем горелки или смесью (спирт + формалин) мазок окрашивают метиленовым голубым Леффлера (над пламенем горелки) в течение 15–20 с. Промывают водой. Дополнительное окрашивание проводят 0,5%-ным раствором нейтрального красного в течение 30 с. Затем промывают водой и высушивают.

Микроскопическая картина: споры голубые или синие, молодые споры – черно-синие, вегетативные формы – розовые, включения (хроматиновые) – фиолетовые.

Окрашивание капсул.

Некоторые микробы способны образовывать капсулу – слизистый слой оболочки, который синтезируется в цитоплазме и секретируется на поверхности клеточной стенки. Размеры их чаще превышают размеры тела микробной клетки. Химический состав капсул различен: одни из них состоят из комплекса белков, другие – из полисахаридов. Капсула и остальная часть клетки окрашиваются неодинаково. Существует несколько методов окрашивания капсул (методы Ольта, Михина, Романовского – Гимзы, Бурри – Гинса).

Метод Ольта. Мазок окрашивают 2–3%-ным раствором сафранина. Краситель готовят перед применением, растворяя его в горячей воде с последующим фильтрованием. Окрашивают при легком нагревании в течение 1–2 мин и быстро промывают водой.

Препарат не высушивают (на нем должна быть вода), накрывают покровным стеклом и рассматривают под иммерсионной системой микроскопа. Световые лучи, проходя через слой воды, усиливают разницу и преломление лучей от капсулы и тела микробной клетки.

В поле зрения микроскопа видно, что тела микробных клеток окрашены в красный цвет, капсулы – в желтый.

Метод Михина. Фиксированный мазок окрашивают метиленовым голубым Леффлера (лучше старым раствором) в течение 2–3 мин при подогревании. Краситель быстро смывают водой, мазок высушивают.

Микроскопическая картина: тела микробных клеток темно-синие, капсулы светло-розовые.

Окрашивание включений (гликогена, гранулезы и зерен волютина).

В цитоплазме микробных клеток часто встречается *гликоген* – животный крахмал (полисахарид). Его можно обнаружить путем добавления к капсуле культуры такого же количества раствора Люголя. При соединении с раствором Люголя гликоген приобретает красную окраску. Такое включение встречается у дрожжей, сенной бациллы и других микробов. Накопление гликогена происходит в том случае, когда в среде имеется достаточное количество углеводов (рис. 4.10).

Гранулеза – полисахарид, крахмалоподобное вещество. В большом количестве содержится в клетках перед спорообразованием. Как и гликоген, гранулеза реагирует на раствор Люголя, она окрашивается им в темно-синий цвет. Много гранулезы содержат маслянокислые бациллы. Для обнаружения гранулезы к капле культуры маслянокислых микробов, выращенных на картофельной среде, добавляют столько же раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Под иммерсионной системой микроскопа видны веретенообразные клетки, окрашенные в синий цвет. На одном из концов таких клеток расположены неокрашенные споры (рис. 4.10).

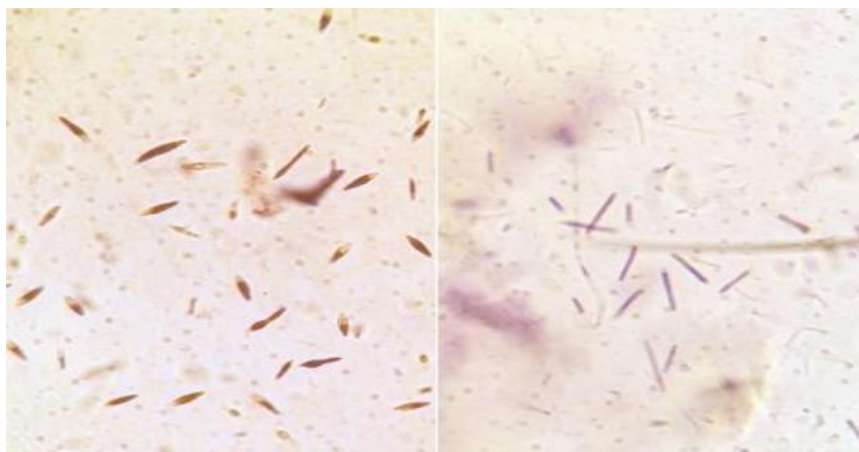


Рис. 4.10. Окраска гликогена (слева) и гранулы (справа) у клостридий, прижизненный препарат, раствор Люголя

Волютин в микробных клетках встречается в виде гранул, которые состоят из полифосфатов и веществ, близких к нуклеиновым кислотам. В них сосредоточены запасы фосфатов. Обнаружить гранулы волютина в микробной клетке можно при окрашивании по Нейссеру (рис. 4.11).

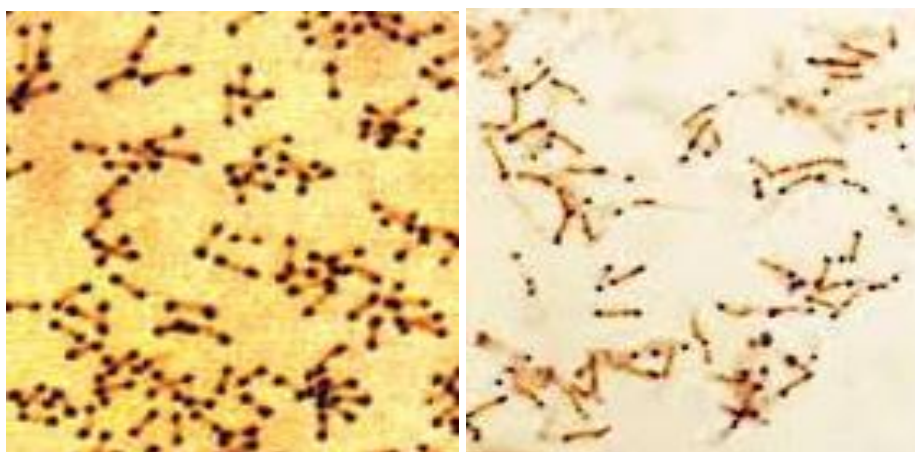


Рис. 4.11. Окрашивание зерен волютина дифтерийной палочки (*Corynebacterium diphtheridae*) по Нейссеру

Окрашивание по Нейссеру. На фиксированный мазок наносят ацетат синьки Нейссера на 2–3 мин, добавляют раствор Люголя на 10–30 с, промывают водой. Мазок докрашивают водным раствором везувина или хризоидина в течение 30–60 с, промывают водой, высушивают, микроскопируют. Зерна волютина имеют щелочную реакцию, поэтому воспринимают ацетат синьки, окрашиваясь в темно-синий цвет. Цитоплазма, имея кислую реакцию, воспринимает везувин и окрашивается в желтый цвет.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные признаки, используемые при идентификации микроорганизмов.
2. Каково назначение сложных методов окраски бактерий? Какие сложные методы окраски бактерий вам известны?
3. Для чего используются дифференциальные (специальные) методы окраски бактерий? Привести примеры.

4. Сущность окраски по методу Циля – Нильсена. Используемые ингредиенты, механизмы и этапы окраски.
5. Метод окраски по Ожешко, его сущность и практическое значение.
6. Сущность окраски по методу Бурри – Гинса, практическое значение.
7. Поясните метод окраски по методу Леффлера.
8. Опишите сущность окраски по методу Нейссера.
9. Как провести дифференциацию кокковых форм бактерий по их взаимному расположению?
10. Каким образом можно провести дифференциацию палочковидных бактерий по их внешнему виду?
11. В чем заключается сущность метода окраски бактерий по Граму?
12. Основные этапы техники окраски бактерий по методу Грама.
13. Какую роль выполняет раствор Люголя при окрашивании по методу Грама?
14. Какие дифференцирующие вещества используются при окраске по Граму?
15. Какие бактерии относятся к грамположительным, а какие – к грамотрицательным? Отличие строения клеточной стенки.
16. В чем заключается сущность метода окрашивания бактериальных спор?
17. Какова техника окраски спор бактерий?
18. Какими методами можно выявить капсулы у бактерий? Как осуществляют окраску капсул?
19. На чем основан принцип широко используемых методов окраски включений?

Лабораторное занятие 5. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ-МАЗКОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУР

Цель занятия: ознакомиться с морфологическим разнообразием микроорганизмов и основными признаками, используемыми при их идентификации; приготовить препараты-мазки из различных культур для изучения их морфологических свойств микроскопическим методом.

Материалы и оборудование: микроскоп; лоток с рельсами для предметных стекол, бактериологические петли, предметные стекла; спиртовка, иммерсионное масло; фильтровальная бумага, набор красок – фуксин Пфейффера, основной раствор генцианвиолета, карболовый фуксин Циля, метиленовый синий спиртовой, раствор Люголя, 96%-ный этиловый спирт; чистые культуры микроорганизмов.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с морфологическим разнообразием микроорганизмов и основными признаками идентификации их.

К морфологическим свойствам относятся не только форма, но и размер клеток, расположение клеток в пространстве, наличие спор и капсул, подвижность и характер окраски бактерий по Граму. Морфология бактерий зависит от условий выращивания на питательных средах, температуры и других факторов. Наиболее типична морфология бактерий в молодых культурах.

Среди основных морфологических форм бактерий различают следующие:

- **шаровидные** (кокковые), которые по характеру взаиморасположения делятся: на микрококки (отдельное расположение); диплококки (сцепленные попарно); тетракокки (сцепленные по четыре); стрептококки (сцепленные в цепочку); сарцины (сцепленные в пакеты по 8, 12, 16 и т. д.); стафилококки (сцепленные беспорядочно в виде виноградной грозди);

- **палочковидные**, которые различаются по форме: правильная (энтеробактерии, псевдомонады); неправильная (коринебактерии);
- **по размеру**: мелкие (бруцеллы, бордетеллы); средние (бактероиды, кишечная палочка); крупные (бациллы, клостридии);
- **по форме концов**: обрубленные (бациллы); закругленные (сальмонеллы, псевдомонады); заостренные (фузобактерии); утолщенные (коринебактерии);
- **по характеру взаиморасположения**: расположенные одиночно; диплобактерии или диплобациллы (сцепленные попарно); стрептобактерии и стрептобациллы;
- **извитые формы** – по характеру и количеству завитков они делятся: на вибрионы (слегка изогнутые палочки или неполные завитки); спириллы (один или несколько завитков); спирохеты, которые, в свою очередь, делятся: на лептоспиры (завитки с загнутыми крючкообразными концами – S-образная форма); боррелии (4–12 неправильных завитков); трепонемы (14–17 равномерных мелких завитков).

Размеры бактерий в среднем составляют 0,5–5,0 мкм. *Escherichia coli*, например, имеет размеры 0,3–1,0×1–6 мкм, *Staphylococcus aureus* – диаметр 0,5–1,0 мкм, *Bacillus subtilis* – 0,75×2–3 мкм. Крупнейшей из известных бактерий является *Thiomargarita namibiensis*, достигающая размера в 750 мкм (0,75 мм). Спирохеты могут вырастать в длину до 250 мкм при толщине 0,7 мкм. В то же время к бактериям относятся самые мелкие из имеющих клеточное строение организмов. *Mycoplasma mycoides* имеет размеры 0,1–0,25 мкм (рис. 5.1).

Кроме описанных форм, которые преобладают среди бактерий, известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булавовидной формы; веретенообразные; ланцетовидные; разветвленные и неразветвленные нитчатые; имеющие вид кольца, замкнутого или разомкнутого в зависимости от стадии роста; ветвящиеся; напоминающие шестиугольную звезду; пластинкообразные; в виде кусочков битого стекла, квадратиков и т. д. (рис. 5.2).

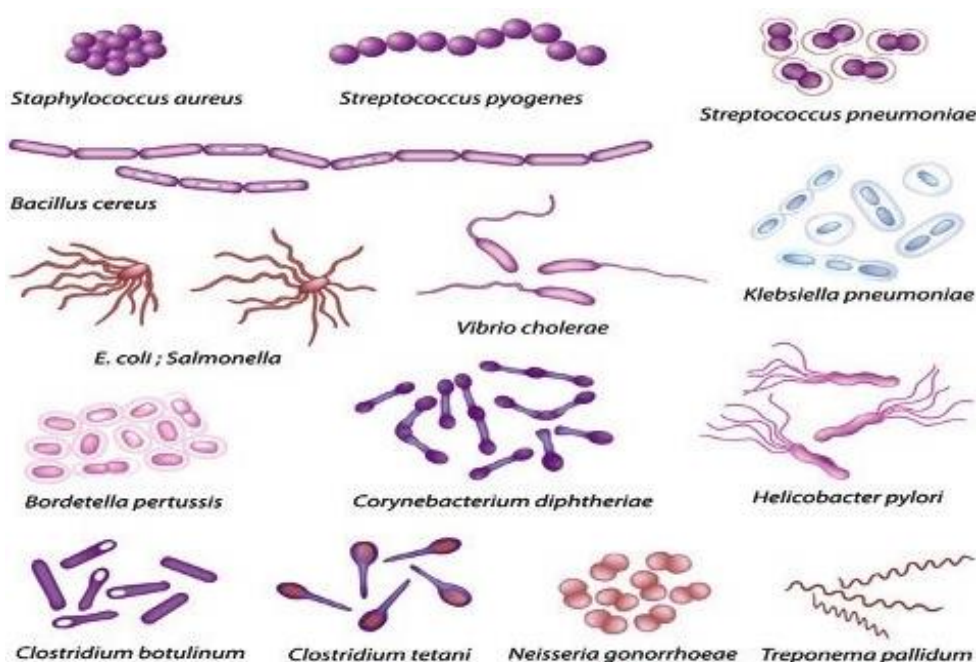


Рис. 5.1. Разнообразие условно-патогенных микроорганизмов

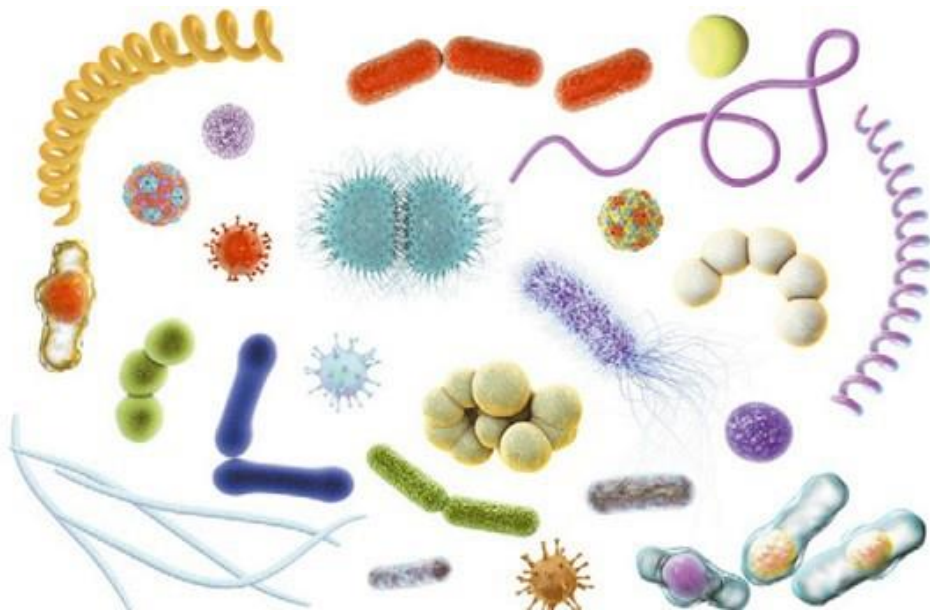


Рис. 5.2. Разнообразие форм бактериальных клеток

Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

Протопластами называют клетки округлой формы, полностью лишённые остатков клеточной стенки и окружённые только цитоплазматической мембраной. Их образование характерно чаще для грамположительных бактерий. *Сферопласты* отличаются от протопластов тем, что у них сохраняются остатки клеточной стенки, а образуются они преимущественно из клеток грамотрицательных бактерий.

Бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию, принято называть *L-формами*.

L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и толщину, и поэтому они плеоморфные (рис. 5.3).

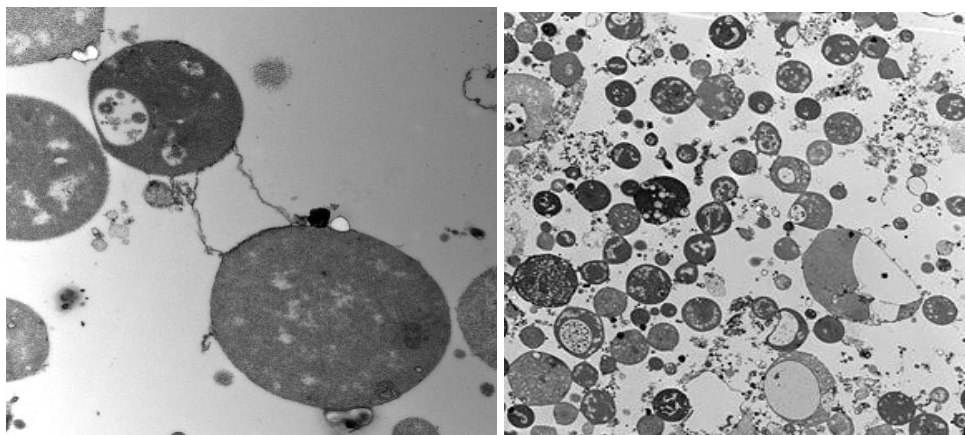


Рис. 5.3. L-формы бактерий

Буква L – первая буква названия Листеровского института в Лондоне, где впервые обратили внимание на развитие морфологически весьма необычных клеток, выделенных из жидкости уха крысы.

Бактерии, у которых отсутствует клеточная стенка, существуют и в природе: это микоплазмы (рис. 5.4).

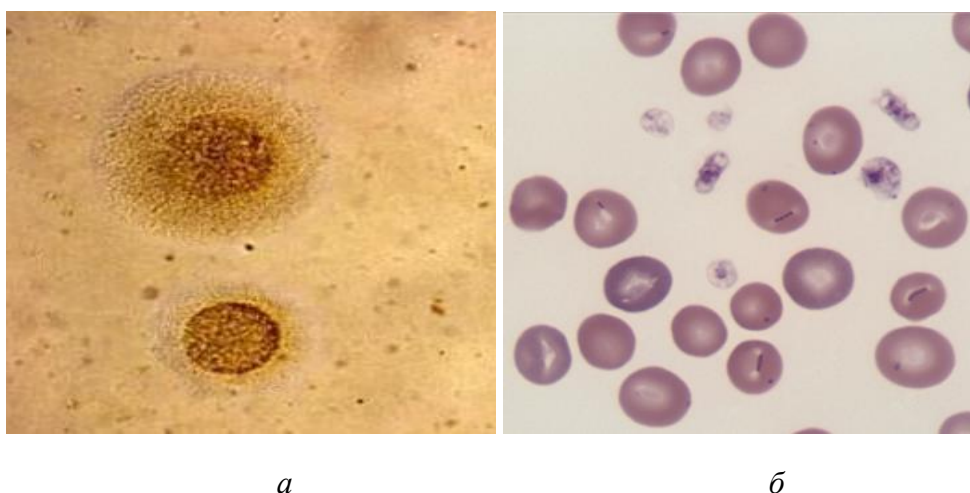


Рис. 5.4. Микоплазмы: а – *Mycoplasma hominis*; б – *Mycoplasma haemocanis*

Микоплазмы – полиморфные микроорганизмы, проходят через мелкопористые фильтры, спор не образуют, грамположительные, неподвижные. Среди микоплазм имеются как сапрофиты, так и паразиты, вызывающие болезни у человека, животных и растений. Описаны разные формы микоплазм: шаровидная, нитевидная, гроздьевидная и другие. Микоплазмы были известны и ранее, но так как они малы по размерам, их относили к вирусам.

Актиномицеты, или лучистые грибы. Под таким названием объединена обширная группа одноклеточных грамположительных микроорганизмов, имеющих тенденцию к ветвлению (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Актиномицеты, или лучистые грибы

Актиномицеты представляют собой одну разветвленную клетку, гифы которой формируют мицелий (грибницу). Он может быть субстратный и воздушный. Актиномицеты совмещают в себе признаки грибов и бактерий. С низшими грибами актиномицеты сближает наличие одноклеточного мицелия, размножение при помощи спор, образование на плотных средах колоний с мицелием; с бактериями – толщина гиф мицелия, окрашивание анилиновыми красителями по Граму, наличие кислотоустойчивых форм, способность расти на мясопептоновом агаре при температуре 35–37 °С. Некоторые виды *Actinomyces* патогенны для человека и животных.

Микромицеты вызывают порчу пищевых продуктов, смазочных масел и других нефтепродуктов, оптических изделий, лакокрасочных покрытий, вызывают коррозию металлов. Грибы разрушают книги, произведения искусства и т. п. Однако значительное число грибов – полезные. Около 150 видов грибов – съедобные и используются в питании.

Систематика организмов, в том числе и грибов, периодически совершенствуется. В настоящее время большинство микологов считают, что развитие грибов шло разными эволюционными путями, в результате чего сформировалось два отдела (*Oomycota* и *Eumycota*).

Настоящие грибы составляют более 95 % всех грибов и объединены в пять классов:

- 1) **хитридиемицеты** (*Chytridiomycetes*);
- 2) **зигомицеты** (*Zygomycetes*);
- 3) **аскомицеты** (*Ascomycetes*);
- 4) **базидиомицеты** (*Basidiomycetes*);
- 5) **дейтеромицеты** (*Deuteromycetes*).

Рассмотрим представителей некоторых классов. *Зигомицеты* – одноклеточные организмы с сильно развитым мицелием, размножаются половым и бесполом путем. Представитель этого класса – **род *Mucor*** (головчатая плесень), которую можно встретить на хлебе, овощах и навозе, в сырых помещениях (рис. 5.6). Многие мукоровые сбраживают углеводы с образованием спирта и органических кислот, используются в пищевой промышленности.

У мукора от одноклеточного мицелия отходят одноклеточные гифы-спорангиеносцы, которые заканчиваются шаровидным утолщением – спорангием (плодовым телом) с эндоспорами, спорангиеспорами. При разрыве спорангия споры выходят во внешнюю среду и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени.

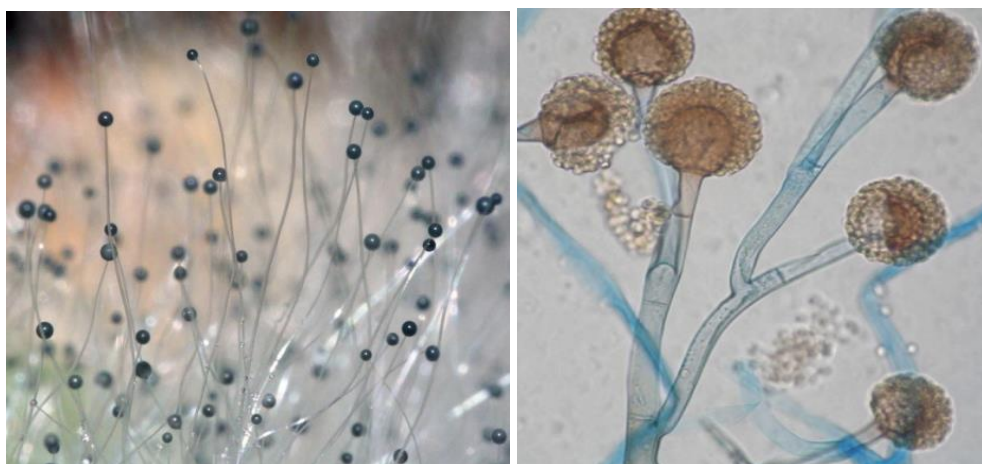


Рис. 5.6. Мукор, или головчатая плесень

Аскомицеты – сумчатые грибы. Представителями этого класса являются **дрожжи** – безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы (рис. 5.7).



Рис. 5.7. Безмицелиальные одноклеточные грибы – дрожжи

Внешне дрожжи представляют собой довольно крупные (до 10 мкм) овальные или округлые клетки. Дрожжи очень широко распространены в природе, они встречаются в почве, на плодах и ягодах, листьях и стеблях многих растений (виноградная лоза, фруктовые деревья).

Наиболее распространенным способом размножения дрожжей является почкование. Среди дрожжей имеются сапрофиты и паразиты. Сапрофиты используются в бродильной промышленности и в животноводстве как источник белка.

Дейтеромицеты (несовершенные грибы) имеют многоклеточный мицелий, размножаются с помощью оидий и конидий. Половой способ размножения не установлен. Грибы этого класса широко распространены в природе: насчитывается около 25 тыс. видов. К дейтеромицетам относят грибы **рода *Aspergillus* и *Penicillium***.

Род *аспергилл*, или леечная плесень. Типичным представителем этого рода является гриб *Aspergillus niger* (рис. 5.8). Тело гриба представляет собой систему трубочек (гиф), по которым передвигается цитоплазма с множеством ядер. От мицелия отходит одноклеточный конидиеносец с утолщением на конце. На головке конидиеносца веерообразно расположены короткие стеригмы, напоминающие шипы, от которых отшнуровываются конидии. Конидии расположены радиально и напоминают струйки воды, выходящей из лейки, отсюда второе название гриба. Конидии леечной плесени бывают окрашены в разные цвета, но чаще встречаются черные (*Aspergillus niger*).

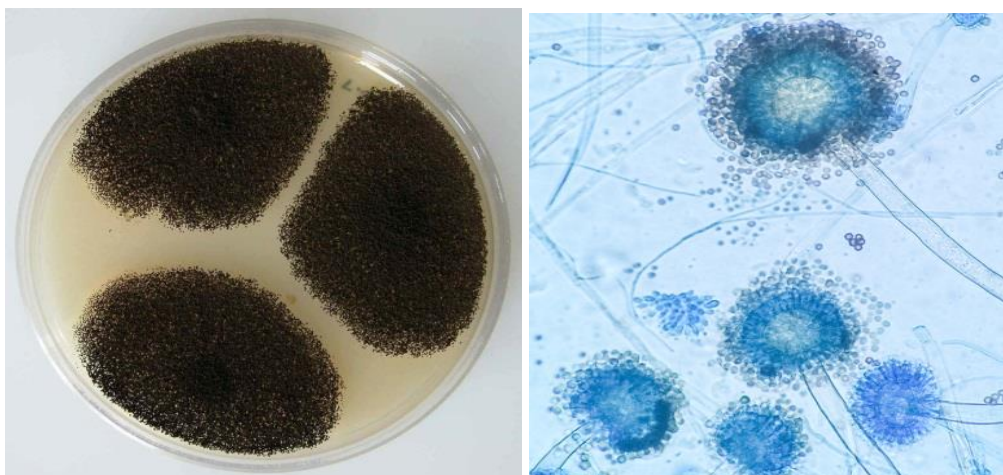


Рис. 5.8. Гриб *Aspergillus niger* (леечная или черная плесень)

Аспергиллы используются для приготовления лимонной, щавелевой и других кислот. Некоторые из них являются продуцентами антибиотиков (аспергиллин, фунигацин, клава-цин).

Род пеницилл, или кистевик. Имеет ветвящийся мицелий. Мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части плодоносящее тело разветвлено в виде кисти, откуда и пошло название плесени (рис. 5.9).

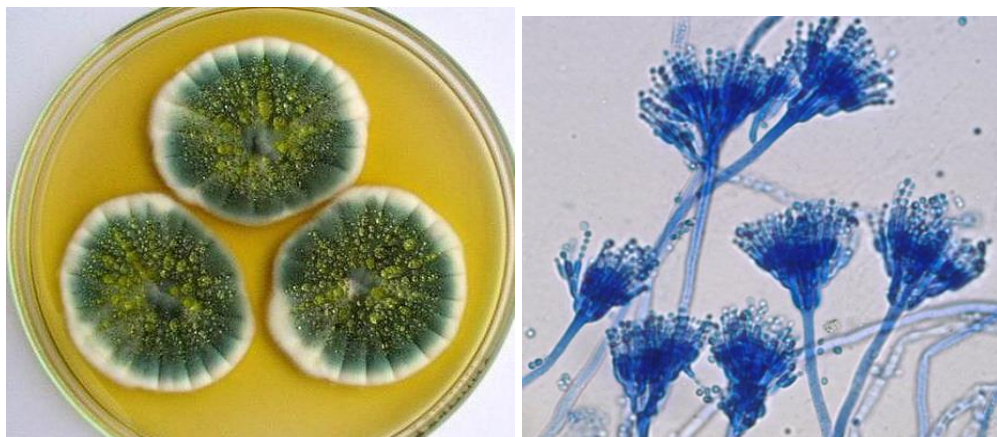


Рис. 5.9. Пеницилл, или кистевик

Последние сегменты кисти – фиалиды (стеригмы) – заканчиваются конидиями. Пеницилловых грибов в природе много, они составляют около половины всех плесневых грибов. В большом количестве они находятся в почве, на кормах, молочных продуктах, фруктах, в сырых помещениях. Чаще встречается зеленая плесень, реже – белая и др. Некоторые виды несовершенных грибов вызывают болезни кожи и волос (трихофития, микроспория, парша и др.).

Род фузариум. Грибы этого рода поражают плоды, овощи и злаки. Мицелий гриба бывает разных цветов (белый, розовый, сиреневый). Для этой плесени характерны серповидные конидии и одноклеточные микроконидии (рис. 5.10). Грибы рода фузариум ведут сапрофитический и паразитический образ жизни. Поражая растения, они вызывают болезнь фузариоз. Если такие грибы встречаются на перезимовавшем хлебе, они могут вызывать у животных фузариотоксикоз (народное название «пьяный хлеб»).



Рис. 5.10. Гриб рода фузариум

Молочная плесень (*Endomyces lactis*) образует белые бархатистые пленки на поверхности молочных продуктов и квашеных овощей. В результате распада септированного мицелия появляются споры оидии. Это крупные, чаще прямоугольной формы клетки. Развиваясь на молочных продуктах, гриб снижает кислотность, при этом создаются благоприятные условия для развития других микробов, которые и вызывают их порчу.

Вирусы – мельчайшие объекты жизни, имеющие неклеточное строение и неспособные к проявлению каких-либо признаков живого вне живых клеток (рис. 5.11).

Первый вирус – вирус мозаичной болезни табака – был открыт русским ученым Д. И. Ивановским в 1892 г.

Каждый вирус в своем онтогенезе проходит две стадии:

- **внеклеточную**, когда вирус находится в состоянии покоя (вирион), в таком состоянии он находится в условиях окружающей среды;
- **внутриклеточную**, в течение которой происходит весь цикл репродукции в клетках хозяина.

При спиральной симметрии капсида вирусная нуклеиновая кислота образует спиральную (или винтообразную) фигуру, полую внутри, и субъединицы белка (капсомеры) укладываются вокруг нее тоже по спирали (трубчатый капсид). Примером вируса со спиральной симметрией капсида является вирус табачной мозаики, который имеет палочковидную форму длиной 300 нм и диаметром 15 нм.

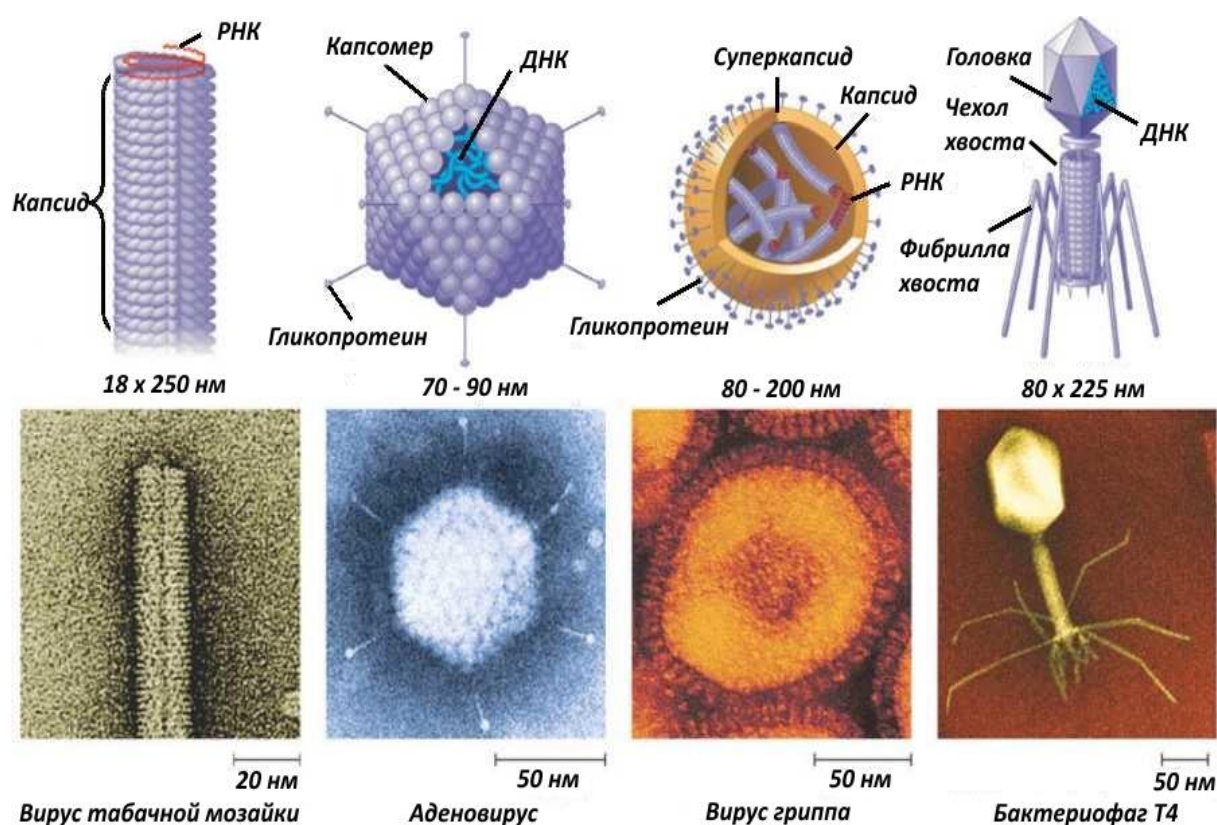


Рис. 5.11. Формы и относительные размеры некоторых вирусов

При кубической симметрии вирусная нуклеиновая кислота уложена плотно (свернута в клубок), а белковые молекулы окружают ее, образуя многогранник (икосаэдр). Икосаэдр – многогранник с 20 треугольными гранями, имеющий кубическую симметрию и приблизительно сферическую форму.

Задание 2. Приготовить препараты-мазки из чистых культур микроорганизмов и окрасить их по Граму.

Задание 3. Оформить и проанализировать результаты исследований.

1. Изучить морфологические свойства микроорганизмов микроскопическим методом.
2. Зарисовать микроскопические картины исследованных чистых культур бактерий и грибов с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма.
3. Под каждым рисунком подписать название микроорганизма, отношение его к окраске.

Контрольные вопросы

1. На какие три основные группы делят бактерии по их форме?
2. Чем отличаются внешне сарцины от стафилококков?
3. Чем характеризуются бациллы?
4. Какие морфологические и физиологические признаки характеризуют класс *Actinobacteria*?
5. Имеются ли патогенные для животных представители среди актинобактерий? Какие заболевания они вызывают?
6. Какие функции выполняет воздушный и субстратный мицелий актинобактерий?
7. Как рассматривается современное систематическое положение грибов в мире живых существ?
8. Какие экологические группы выделяют среди грибов?
9. Какие способы размножения известны у грибов?
10. Какие типы питания встречаются у грибов?
11. Какими признаками характеризуются роды *Penicillium* и *Aspergillus*?
12. В чем заключаются особенности морфологического строения дрожжевых грибов?
13. Имеются ли среди дрожжевых грибов патогенные для человека виды? Какие заболевания они вызывают?
14. Какие промышленно важные биологически активные вещества образуют дрожжи?
15. Какое значение в природе имеют дрожжевые грибы?

Лабораторное занятие 6. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И МЕТОДИКА ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ И ИНСТРУМЕНТОВ

Цель занятия: ознакомиться с основными питательными средами и методикой их приготовления; изучить методы стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и инструментов.

Материалы и оборудование: колбы, пробирки; сухие питательные среды, набор готовых сред для микроорганизмов различных классов; полусинтетический МПА, автоклавы, сушильные шкафы, пипетки, стерильные чашки Петри, стерилизаторы, стеклянные палочки, термостат, химический стакан.

Ход занятия

Задание 1. Изучить основные требования, предъявляемые к питательным средам для культивирования микроорганизмов.

Мир микробов обширен и разнообразен. Индивидуальные потребности отдельных видов бактерий в питательных веществах различны. Поэтому универсальной питательной среды, пригодной для культивирования всех видов микроорганизмов, не существует.

При конструировании питательных сред для каждого определенного вида бактерий

необходимо учитывать особенности метаболизма и их индивидуальные потребности в тех или других питательных веществах. Среды для одного и того же вида микроорганизмов могут быть разными в зависимости от практических потребностей и задач исследований. Например, среда для длительного хранения ценных музейных штаммов может значительно отличаться от сред, предназначенных для промышленного изготовления биопрепаратов диагностического, профилактического и лечебного назначения.

Однако наличие даже благоприятной питательной среды не является единственным условием для выращивания микробов. Жизнедеятельность их протекает в тесной зависимости от других факторов, например, от доступа воздуха. Аэробам необходим кислород, анаэробам, наоборот, он противопоказан, так как они используют молекулярный кислород, получаемый путем отщепления от безазотистых органических веществ.

Несмотря на громадное количество предложенных сред, и их модификаций, к ним предъявляются следующие *общие требования*.

Требования, предъявляемые к питательным средам:

1) должны содержать вещества, необходимые для жизнедеятельности клетки. В состав их должны входить: соли (натрия, калия и других элементов), микроэлементы (цинк, железо, медь, хром и т. д.), органогены (азот, углерод, водород, кислород) и факторы роста (витамины, гормоны и т. д.);

2) должны иметь определенную концентрацию водородных ионов. Для большинства видов бактерий показатель рН составляет 7,2–7,4. Кроме того, чтобы во время роста микробов кислые и щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны содержать вещества, способные нейтрализовать продукты обмена, т. е. обладать буферностью;

3) должны быть изотоничны, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как и внутри микробной клетки. Для большинства микробов среды должны содержать 0,5%-ный раствор натрия хлорида;

4) должны быть стерильными, так как изучать биологические свойства можно только в чистом виде, посторонние микробы изменяют свойства среды;

5) среды (скошенные МПА) должны быть влажными, но не слишком вязкими, так как питание микробов осуществляется за счет осмоса и диффузии;

6) должны содержать постоянные количества отдельных ингредиентов: для культивирования патогенных бактерий – 0,8–1,2 г/л аминного азота (NH_2), 2,5–3,0 г/л общего азота (N), 0,5 г/л хлоридов в пересчете на NaCl, 1 % пептона;

7) жидкие среды, кроме молока, должны быть прозрачными. В связи с этим их подвергают фильтрации.

Различные питательные среды используют для выделения, выращивания и длительного сохранения микроорганизмов в культурах.

Задание 2. Ознакомиться с классификацией питательных сред по происхождению (по составу), по физическому состоянию и по назначению.

По составу питательные среды делятся на *естественные* (натуральные), *искусственные* (синтетические) и *полусинтетические* (рис. 6.1).



Рис. 6.1. Разновидности питательных средств по происхождению

Натуральные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения (мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и др.), поэтому точный состав этих сред неизвестен. Их используют в том случае, когда хотят вырастить различные виды микроорганизмов.

Состав **синтетических питательных сред** точно известен, и их используют при изучении характерных особенностей обмена веществ у различных микроорганизмов. Искусственные среды готовят из различных ингредиентов – МПА, МПБ и др.

Чаще всего используют **полусинтетические среды**. В их состав, кроме веществ известной химической природы, входят продукты растительного и животного происхождения. Примером таких сред могут быть мясопептонные среды, в которые, кроме мясного экстракта и пептона, входят: поваренная соль, фосфат калия. Полусинтетические среды хороши для выращивания определенных групп микроорганизмов, а также для выделения из среды продуктов их жизнедеятельности: антибиотиков, витаминов.

По физическому состоянию питательные среды бывают *плотные, жидкие и полужидкие* (рис. 6.2). Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, к которым для получения нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин.

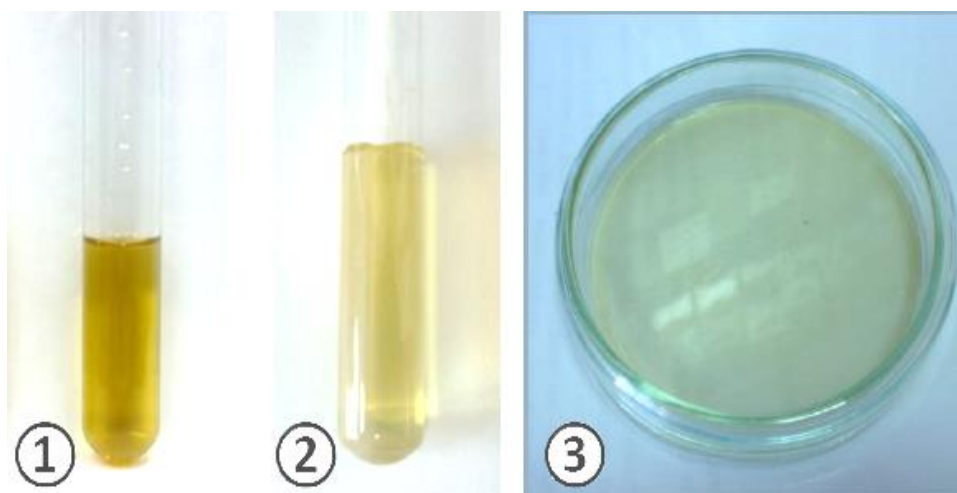


Рис. 6.2. Разнообразие питательных сред по физическому состоянию:
1 – жидкая; 2 – полужидкая; 3 – плотная

Агар-агар – это полисахарид, получаемый из морских водорослей. В микробиологии используют агар-агар, поскольку он не является питательным веществом для микробов и служит только для уплотнения среды. В воде он плавится при температуре 80–100 °С, застывает при температуре 30 °С.

Желатин – белок животного происхождения, получаемый путем выварки связок, фасций, сухожилий. Среда, содержащая желатин, при температуре 25–30 °С плавится, поэтому культуры на них выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при pH ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Микробы, обладающие протеолитическими свойствами, желатиновые среды разжижают.

По назначению питательные среды разделяют:

- на *общеупотребительные*, пригодные для культивирования многих бактерий;
- *дифференциальные*, позволяющие различать бактерии разных видов и родов;
- *элективные* (избирательные), создающие благоприятные специфические условия для разведения определенного вида организмов и угнетения размножения других видов;
- *обогащения*, благоприятствующие размножению бактерий определенных видов и подавляющие рост других;
- *специальные*, наиболее оптимальные для культивирования бактерий тех или иных видов;
- *консервирующие*, способствующие сохранению патогенного вида микробов в патологическом материале (рис. 6.3).



Рис. 6.3. Многообразие питательных сред по назначению

Задание 3. Освоить рецепты приготовления общеупотребительных питательных сред. Приготовить питательную среду из готового полусинтетического порошка МПА.

Основой многих питательных сред является *мясная вода*. Для ее приготовления к одной части мясного фарша (телятина, говядина, конина) добавляют две части воды, экстрагируют в течение 12–24 ч при температуре 4–6 °С, кипятят в течение 1 ч, добавляя дистиллированную воду до первоначального объема. Затем фарш отжимают через 2–3 слоя марли, а жидкую часть фильтруют через бумажный фильтр.

Для получения *дрожжевой воды* 100 г сухих прессованных дрожжей разводят в 1 л водопроводной воды, кипятят в течение 10 мин, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 3 дня по 30 минут текучим паром. Полученная жидкость вполне заменяет мясную воду.

Мясопептонный бульон (МПБ) получают следующим образом. В мясную воду вносят 1

% сухого пептона, 0,5 % натрия хлорида, 10 % воды на выкипание, кипятят до растворения ингредиентов, устанавливают рН 7,2–7,4 деценормальным раствором КОН (NaOH), вновь кипятят в течение 20 мин, отстаивают и окончательно определяют рН. Затем бульон фильтруют, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при давлении 0,1 МПа (1,0 атм) в течение 30 мин.

При подготовке *пептонной воды* к дистиллированной воде добавляют 1 % пептона, 0,5 % NaCl, растворяют при подогревании, устанавливают нужный уровень рН, автоклавируют при давлении 0,1 МПа (1,0 атм) в течение 20–30 мин.

Снятое или обезжиренное молоко для получения питательной среды подщелачивают до рН 7,6–7,8 10%-ным раствором соды, разливают по 10 мл и стерилизуют при давлении 0,05 МПа (0,5 атм) в течение 30 мин или текучим паром в течение 3 дней.

Для приготовления *лакмусового молока* к обезжиренному молоку добавляют 5–10 % лакмусовой настойки и столько же 10%-ного раствора соды, чтобы молочная пена приняла сиренево-фиолетовый оттенок. Среду разливают в пробирки и стерилизуют, как молоко.

В случае подготовки *среды Эндо* к 100 мл расплавленного горячего МПА (рН 7,6) асептически добавляют 1 г химически чистой лактозы, растворенной в 5 мл дистиллированной воды, и перемешивают. Среду охлаждают до температуры 70 °С и прибавляют смесь из 0,5 мл раствора насыщенного основного фуксина и 1,25 мл свежеприготовленного раствора сульфата натрия. После перемешивания среду разливают в чашки Петри. Для подсушивания агара чашки ставят в термостат при температуре 37 °С. Среда готовится по мере надобности и не подлежит хранению.

Приготовление питательной среды на примере МПА. Мясопептонный агар состоит из мясного экстракта, пептона, хлорида натрия, дигидрофосфата натрия и агар-агара.

Для приготовления питательной среды (на одного студента) 1,5 г порошка готового полусинтетического МПА заливают в химическом стакане 50 мл дистиллированной воды, перемешивая, доводят раствор до кипения и, не охлаждая, осторожно через воронку разливают в чашки Петри или четыре пробирки. При этом среда не должна попадать на верхнюю часть пробирки. Затем пробирки закрывают ватными пробками, обвязанными марлей, и стерилизуют в автоклаве.

Мясопептонный агар (МПА) можно приготовить и таким образом: 500 г мяса измельчают, заливают 1 л воды и настаивают в течение 12–15 ч при комнатной температуре, затем кипятят в течение 30 мин, а после охлаждения отвар процеживают через 2–3 слоя марли. Наливают в кружку и при подогревании и помешивании добавляют 0,5 г пептона и 25 мг поваренной соли. Затем в горячем состоянии фильтруют через двойной бумажный фильтр.

После остывания проверяют значение рН по лакмусу или универсальному индикатору и устанавливают слабощелочную реакцию, добавляя 10%-ный раствор едкого натра. К полученному мясопептонному бульону прибавляют 1,5 г агар-агара и доводят до кипения. Расплавленный мясопептонный агар в горячем состоянии фильтруют через гигроскопическую вату с марлей и быстро разливают по 15 мл в пробирки через воронку. Пробирки закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве.

Приготовленная питательная среда используется для выращивания микроорганизмов при исследовании воды, почвы, воздуха.

Задание 4. Ознакомиться с правилами подготовки к стерилизации питательных сред, лабораторной посуды, инструментов.

Стерилизация.

Стерилизация – важнейший этап и главное условие получения чистых культур микроорганизмов. Стерилизуют посуду, инструменты и сами питательные среды, используемые в работе. Существует *термическая* и *холодная* стерилизация.

Термическая стерилизация осуществляется горячим воздухом, насыщенным под давлением паром, прокаливанием на огне, кипячением и др.

1. *Прокаливание на огне* (фламбирование): в пламени горелки или спиртовки обычно стерилизуют петли и иглы для посева, предметные стекла, инструмент.

2. *Кипячение* – в течение 30 мин при температуре 100 °С обычно кипятят шприцы, иглы, пищевые продукты и др. При этом могут сохраняться споры бактерий.

3. *Стерилизация сухим жаром* – в специальном сушильном шкафу, как правило, стерилизуют хорошо вымытую посуду: колбы, пробирки и другую лабораторную посуду (рис. 6.4). При температуре 160–170 °С погибают не только все микроорганизмы, но и их споры.



Рис. 6.4. Сушильные шкафы: *а* – модель ES-4620; *б* – модель ПЭ-4620М

4. *Стерилизация паром* проводится при температуре 100–120 °С, так как во влажной атмосфере микроорганизмы погибают быстрее при более низкой температуре.

Существует два способа **стерилизации паром**:

а) *стерилизация насыщенным паром* под давлением (примерно в 1 атм) обычно осуществляется в автоклаве при температуре около 120 °С (рис. 6.5). Микроорганизмы и их споры погибают через 30–40 мин. Этот способ не приемлем для тех сред, которые содержат в своем составе белки или другие вещества, разрушающиеся при высокой температуре;

б) *стерилизация текучим паром* в аппарате Коха при температуре 100 °С в течение 30–40 мин. Если нет аппарата Коха, можно использовать простую кастрюлю, наливая в нее небольшой слой воды. Однако следует помнить, что споры бактерий не погибают при однократном нагревании. Поэтому для полного обеспложивания текучим паром применяют повторные стерилизации, всего 3–4 раза с интервалом через сутки. В период между нагреваниями жизнеспособные споры прорастают, а при повторном нагревании развивающиеся молодые клетки погибают. Такой метод называют *тиндализацией*, или *дробной стерилизацией*.



Рис. 6.5. Лабораторные автоклавы: *а* – медицинский автоклав RAYPA AE-80 MP; *б* – горизонтальный автоклав RAYPA AHS-50-N

5. *Пастеризация* – метод, применяемый для уничтожения неспорозоносных бактерий в питательных средах (вине, молоке), теряющих свои качества при кипячении. Пастеризуют среды в течение 15–30 мин при температуре 50–60 °С или в течение 5–10 мин при температуре 70–80 °С в водяной бане или термостатах. В пищевой промышленности пастеризацию используют для обработки продуктов, теряющих вкусовые качества при кипячении (молоко (рис. 6.6), соки, вино, пиво).



Рис. 6.6. Пастеризаторы для молока: *а* – пастеризационно-охладительная установка АСУ ТП; *б* – молочное такси

Холодная стерилизация проводится путем фильтрования или облучения УФ-лучами тех сред, которые не выдерживают нагревания, содержащие белки, витамины, антибиотики:

а) стерилизация фильтрованием – применяется для жидкостей, не выдерживающих нагревания. Для этого используют мелкопористые фильтры, в последнее время распространены мембранные (задерживающие бактерии и их споры и даже вирусы и бактериофаги). Перед фильтрованием фильтры стерилизуют кипячением. Само фильтрование ведется под вакуумом;

б) стерилизация УФ-лучами – ведется с применением кварцевых ламп, которые пропускают УФ-лучи. Питательные среды и другие предметы помещают на расстоянии 20–30 см от источника света на 20 мин. При этом воздействии погибают микроорганизмы, но остаются живыми их споры.

При такой стерилизации используют бактерицидные лампы (рис. 6.7) для обеззараживания воздуха в помещениях (боксах, операционных). Их применяют в пищевой промышленности для хранения различных продуктов при температуре выше 0 °С.

Конкретно стерилизация различных сред описана в специальных источниках, справочниках.



Рис. 6.7. Бактерицидные УФ-рециркуляторы воздуха для разных типов помещений

Стерилизация ультразвуком. Ультразвук является физическим стерилизующим фактором и используется, например, для обеззараживания воды, молока, некоторых продуктов, кожевенного сырья (рис. 6.8). Стерилизующее действие его связано с разрушением бактериальной клетки под действием возникающих в цитоплазме кавитационных пузырьков.



Рис. 6.8. Приборы для стерилизации ультразвуком: а – цифровая ванна «Sonicator»; б – ультразвуковой очиститель «Q125 Sonicator»

Стерилизация с помощью химических веществ (хлороформ, толуол, эфир, фенол, формалин, борная кислота, глицерин) применяется с ограничениями, чаще для консервирования с целью предупреждения бактериального загрязнения сред, вакцин, а также лечебных и диагностических сывороток различными химическими соединениями (соли металлов, щелочи, антибиотики и др.).

Задание 5. Отработать технику обеззараживания бактериологических петель, шпателей и других инструментов методом фламбирования. Освоить технику подготовки лабораторной посуды, металлических инструментов, пипеток, ватно-марлевых пробок к стерилизации.

Контрольные вопросы

1. Какие требования предъявляются к питательным средам?
2. Классификация питательных сред по происхождению, по физическому состоянию и по целевому назначению среды.
3. Методы стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и инструментов.
4. Основные физические методы стерилизации.
5. Что такое пастеризация? Где она используется?
6. Перечислите основные цели применения питательных сред в микробиологии.

Лабораторное занятие 7. ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРООРГАНИЗМОВ НА РАЗНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. РЕЖИМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомиться с условиями культивирования микроорганизмов; изучить методы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов; освоить методы посева и выращивания бактерий в плотной и жидкой питательной среде; отработать технику посева аэробных микроорганизмов на МПБ, МПА.

Материалы и оборудование: жидкие (МПБ, пептонная вода), плотные (МПА), чистые культуры бактерий, выращенные на жидких и плотных питательных средах; бактериологические петли, микробиологические иглы, шпатели, восковой карандаш; газовые горелки; термостат с температурой 37 °С; анаэростат, прибор Аристовского.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с условиями культивирования микроорганизмов (аэробов и анаэробов).

Для роста микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как **кислотность среды, аэрация, температура, свет, влажность**. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто не одинаковы.

Активная кислотность среды (рН) имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше всего растет при рН близком к 7,0, напротив, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среды. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определить значение рН. Значение рН сред может измениться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести до нужного, если это требуется, стерильными растворами кислоты или щелочи.

В процессе культивирования микроорганизмов кислотность питательной среды часто меняется. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных компонентов среды. Поддержание определенного значения рН во время роста особенно важно для тех микроорганизмов, которые образуют в процессе жизнедеятельности кислоты, но не обладают устойчивостью к ним. К их числу относятся молочнокислые бактерии.

Аэрация. По типу дыхания бактерии разделяют на четыре группы:

- **облигатные, или строгие, аэробы**, которые могут расти только при наличии кислорода;
- **микроаэрофилы**, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении кислорода меньшем, чем в воздухе;
- **факультативные анаэробы**, которые способны расти как в присутствии, так и в отсутствии молекулярного кислорода (например, некоторые дрожжи или энтеробактерии в зависимости от наличия кислорода осуществляют аэробное дыхание или брожение);

• *облигатные анаэробы* (клостридии ботулизма, газовой гангрены, столбняка, бактероиды и др.), которые растут только на среде без кислорода, который для них токсичен. Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия и в способах их культивирования.

Для культивирования анаэробов необходимо создать определенные условия, т. е. удалить молекулярный кислород из питательной среды и пространства, окружающего эти культуры.

Наиболее простым способом удаления растворенного кислорода является кипячение среды. Непосредственно перед посевом материала пробирки со средами кипятят на водяной бане в течение 15–20 мин. Быстро охлаждают и для уменьшения диффузии кислорода из воздуха питательные среды заливают сверху стерильным вазелиновым маслом (1,0–1,5 см).

Приборы для культивирования анаэробов: прибор Аристовского, анаэростат (рис. 7.1).

Прибор Аристовского представляет собой металлический цилиндр, диаметр которого соответствует диаметру чашек Петри. Поглощение кислорода осуществляется химическими поглотителями.

Две половинки от чашки Петри наполняют углекислой содой, на поверхность которой насыпают тонкий слой гидросульфита натрия в количестве 1,5 г и слегка увлажняют водой из пульверизатора. Одну половину чашки с содой ставят на дно ведерка и на нее помещают чашки Петри с посевами; вторую половину чашки помещают поверх засеянных чашек. После этого ведро опускают в аппарат, герметически закрывают его крышкой и ставят в термостат.

Анаэростат представляет собой толстостенный металлический цилиндр с герметически привинчивающейся крышкой, на которой имеются вакуумметр и два крана для присоединения к вакуум-наосу. В прибор помещают чашки с посевами, откачивают воздух, кран закрывают и помещают в термостат для культивирования.



Рис. 7.1. Приборы для культивирования анаэробов:
а – прибор Аристовского; *б* – анаэростат

Температура. Интервалы температур, в которых возможен рост различных микроорганизмов, заметно варьируются. У мезофилов, к которым относится большинство известных бактерий, температурный оптимум лежит в интервале 25–37 °С. У термофилов он значительно выше – от 45 до 80–90 °С. Психрофилы хорошо развиваются в интервале температур 5–10 °С. Даже незначительные колебания температурного режима неблагоприятно сказываются на росте и развитии микроорганизмов. Поэтому мезофильные микроорганизмы выращивают в термостатах или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура. Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры.

Задание 2. Изучить методы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.

В результате культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов применяется ряд следующих методов:

- культивирование на поверхности плотных и жидких сред;
- глубинное культивирование в жидких средах;
- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;
- выращивание в анаэростатах.

Культивирование на поверхности плотных и жидких сред. В этом случае микроорганизмы выращивают на поверхности плотной среды или в тонком слое жидкой среды, и кислород поступает к ним непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании важно увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном – чашки Петри, колбы, матрацы и т. д., в жидких средах аэробные микроорганизмы часто растут, образуя на поверхности пленку. Факультативные анаэробы развиваются не только на поверхности, но и в толще жидкой среды, вызывая более или менее равномерное ее помутнение. Поверхностное культивирование микроорганизмов применяется как в лабораторных условиях, так и в промышленности.

Глубинное культивирование в жидких средах. Все способы глубинного культивирования аэробных микроорганизмов сводятся к увеличению поверхности соприкосновения питательной среды с кислородом воздуха. Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на качалках, обеспечивающих встряхивание или вращение колб или пробирок. Чем больше скорость вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом.

Помимо перемешивания аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием через толщу среды стерильного воздуха. Этот способ часто используют в лабораторных исследованиях, но особенно широкое применение он нашел в промышленной микробиологии при получении биомассы и различных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов – антибиотиков, ферментов, кислот.

Выращивание в высоком слое среды. Это наиболее простой способ ограничения доступа воздуха к клеткам микроорганизмов. Жидкую среду наливают в сосуды для культивирования высоким слоем. Непосредственно перед посевом среду кипятят или прогревают на кипящей водяной бане 30–40 мин, затем быстро охлаждают, чтобы в ней не успел раствориться кислород воздуха, и вносят на дно посевной материал.

Выращивание в толще плотной среды. Этим приемом пользуются для получения изолированных колоний при выделении чистых культур или определении численности анаэробных микроорганизмов. Посевной материал вносят в расплавленную и остуженную до температуры 48–50 °С агаризованную, желательно осветленную среду, тщательно перемешивают и оставляют в пробирках или переливают стерильной пипеткой в другую стерильную посуду (трубки Бурри или чашки Петри). Поверхность среды в пробирках или трубках Бурри заливают парафином. При использовании чашек Петри для выращивания анаэробов засеянную агаризованную среду наливают в крышку чашки и, после того как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки, где среда соприкасается с воздухом, заливают стерильным парафином.

Выращивание в анаэростатах. Анаэробные микроорганизмы можно выращивать в анаэростатах – вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Из анаэростата откачивают воздух, а затем, как правило, заполняют его газовой смесью, состоящей из азота (90–80 %) и углекислоты (10–20 %), до давления порядка 500 мм рт. ст. Избыточное давление исключает возможность диффузии кислорода воздуха.

Задание 3. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.

Посев петлей на среду в чашку Петри. Для равномерного распределения микроорганизмов в жидкой среде пробирку с культурой осторожно, чтобы не смочить пробку, встряхивают или, зажав между ладонями, вращают в одну, а затем в другую сторону.

Пробирку с культурой бактерий держат в левой руке, а бактериологическую петлю – в правой. Петлю обеззараживают над пламенем горелки.

Края пробирки при вынимании пробки прижигают. Пробку прижимают мизинцем правой руки к ладони и после извлечения держат в руке. Петлю осторожно вводят в пробирку с культурой и охлаждают. При взятии материала на петле образуется тонкая прозрачная пленка – «зеркальце». Чашку Петри с агаровой средой, заранее подписанную, приоткрывают под углом во избежание попадания микробов извне. Бактериологическую петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и проводят зигзагообразные штрихи по всей поверхности среды. Штрихи, наносимые петлей, располагают как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микробов (рис. 7.2).

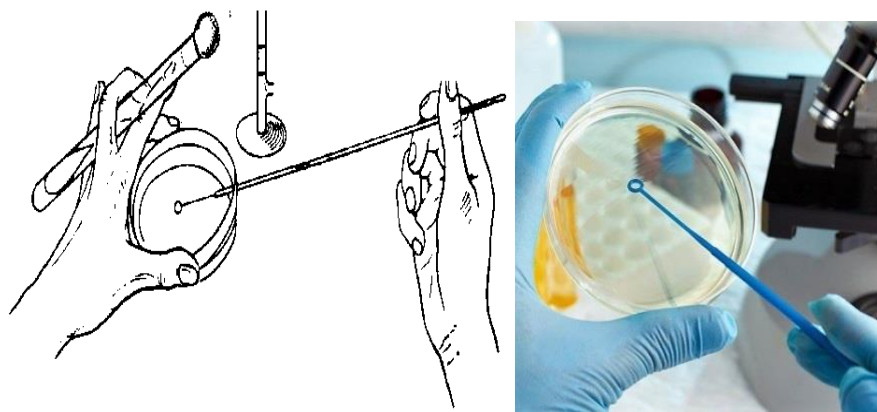


Рис. 7.2. Посев петлей на питательную среду в чашку Петри

Окончив посев, петлю фламбируют, чтобы уничтожить, оставшиеся микробы, предварительно обеззаразив край и ту часть пробки, которая входит в горлышко пробирки.

Чашку Петри с посевами переворачивают вверх дном, во избежание размыва колоний конденсационной водой, и помещают в термостат для культивирования.

Посев в толщу питательной среды. Из бактериальной культуры, подлежащей посеву, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или физиологическом растворе.

Набирают культуру бактерий стерильной пипеткой в объеме 0,1; 0,5 или 1,0 мл (в зависимости от предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Чашку заливают 10–15 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40–45 °С. Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку слегка вращают круговыми движениями по поверхности стола. После застывания чашку Петри со стороны дна подписывают, переворачивают вверх дном и ставят в термостат для культивирования.

Посев уколом в столбик питательной среды. Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку и в центр столбика до дна пробирки правой рукой вкалывают петлю с находящимся на ней материалом. Пробирку закрывают пробкой, в верхней третьей части подписывают восковым карандашом. В штативах помещают в термостат для инкубирования.

Посев шпателью на среду в чашку Петри. Исследуемую микробную культуру наносят

на поверхность питательной среды у края чашки. Стерильным шпателем Дригальского распределяют посевной материал равномерно по всей поверхности среды в виде параллельных штрихов. Чашку подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат для выращивания.

Как правило, при таком посеве микробы растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Данный посев применяют при получении культур одного вида.

Посев в жидкие питательные среды. При посеве и пересеве в жидкую питательную среду обе пробирки (одна с исследуемой культурой, другая с питательной средой) берут в левую руку между большим и указательным пальцами так, чтобы их основания находились поверх кисти руки (рис. 7.3).

Все действия проводят над пламенем горелки (радиус равен 10–15 см). Пробки из пробирок вынимают мизинцем и безымянным пальцем правой руки. Края пробирок при вынимании пробок прижигают. Остальные три пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериологической петли или пипетки, посредством которых материал переносят из одной пробирки в другую и распределяют в питательной среде.

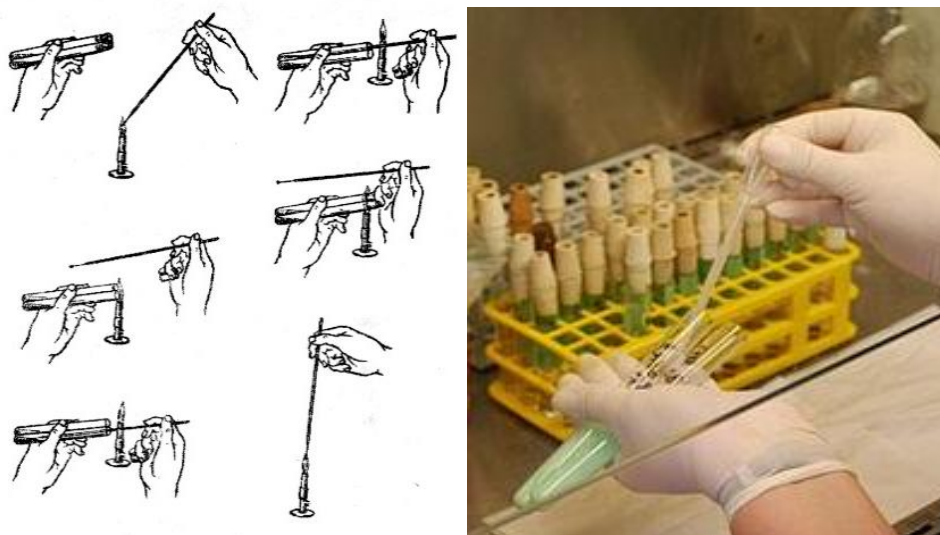


Рис. 7.3. Пересев из одной пробирки в другую

Бактериальную петлю прокалывают над пламенем горелки. Чтобы остудить горячую петлю, ее вводят вглубь пробирки и погружают в конденсационную жидкость. При взятии петлей материала для посева должна образоваться в кольце петли тонкая пленка – «зеркальце». Петлю с посевным материалом погружают в питательную среду.

Петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают.

Петлю вновь прокалывают в пламени горелки и ставят в штатив. Пробирку с посевами подписывают, ставят в штатив и помещают в термостат для культивирования.

Задание 4. Произвести посевы аэробных микроорганизмов на МПБ, МПА.

Контрольные вопросы

1. Техника посева и пересева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды.
2. Какие условия культивирования микроорганизмов вы знаете?
3. Перечислите методы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.

4. Назовите и опишите приборы, которые используются для культивирования анаэробных микроорганизмов.
5. Опишите посев на плотную среду в чашку Петри.
6. Как проводится посев в жидкие питательные среды?
7. Как проводится перенос материала из одной пробки в другую?
8. Каким образом проводится посев в толщу питательной среды?
9. Какова наиболее благоприятная для большинства патогенных микробов температура?
10. Для чего предназначены термостаты?
11. Назовите основные техники посева микроорганизмов на плотные питательные среды?

Лабораторное занятие 8. УЧЕТ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ И МОРФОЛОГИИ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

Цель занятия: проанализировать культуральные свойства и морфологию клеток выросших в чашках Петри колоний микроорганизмов.

Материалы и оборудование: бактериологическая петля и препаровальная игла, стеклянные шпатели, микробиологические пипетки, восковые карандаши; пробирки, чашки Петри с выросшими культурами, лупа, микроскоп; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего); 96%-ный этиловый спирт; газовые горелки, термостат.

Ход занятия

Задание 1. Рассмотреть, выделенные изолированные колонии, отличающиеся по внешнему виду, описать культуральные свойства микроорганизмов. Описать в тетради колонии по предложенному плану.

Культуральную характеристику роста бактериальных колоний на питательной среде дают после их визуального осмотра. Они могут иметь массу морфологических и культуральных различий, кроме того, способны меняться с течением времени. *Молодые и старые колонии бактерий всегда описывают по культуральным свойствам отдельно.*

Для изучения свойств колоний микробы культивируют на плотных питательных средах в чашках Петри. При посеве материала стараются получить изолированный рост колоний. Чашки с посевом просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой. Рассматривая выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы, описывают следующее.

1. Форма колоний. Бактериальные колонии по этой культуральной характеристике могут быть плоскими, округлыми, ризоидными (напомянуть переплетение корней) или гирозными (напоминающими по форме головной мозг), иметь ровные, хорошо очерченные или рваные края (рис. 8.1).

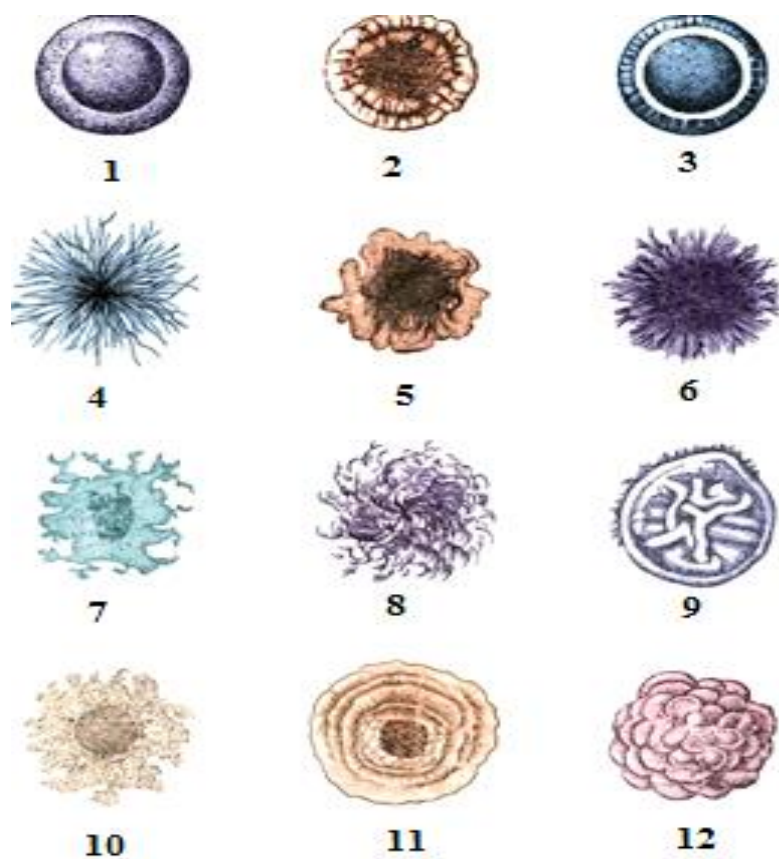


Рис. 8.1. Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амебовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

2. Размеры колоний. Колонии, имеющие диаметр более 4 мм, являются крупными, от 2 до 4 мм – средними, от 1 до 2 мм – мелкими, менее 1 мм – точечными или росинчатыми (рис. 8.2).

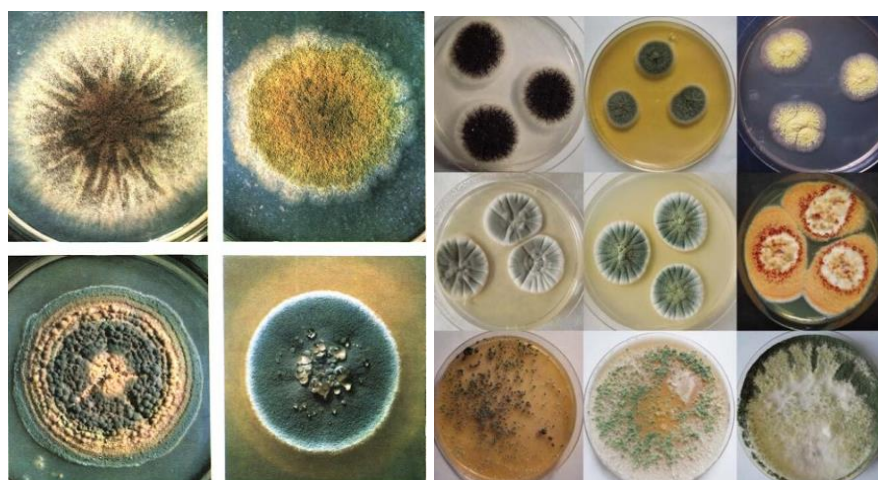


Рис. 8.2. Размер как важная характеристика морфологии колоний

3. Цвет колоний. Микроорганизмы, содержащие пигменты могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и других цветов. Большинство микроорганизмов не содержат пигментов и растут на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии

называют бесцветными (рис. 8.3).

4. Рельеф (профиль) колоний. Рельеф, или профиль, колоний может быть плоским, выпуклым, куполообразным, смешанным – плоским с выпуклым центром, кратерообразным и др. (рис. 8.4).

5. Поверхность колоний. Поверхность колоний может быть гладкой, блестящей, шероховатой (складчатой, гирозной, бородавчатой, мелкозернистой), морщинистой, извилистой и т. д. (рис. 8.5). Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые – буквой R (rough), что означает соответственно «гладкий» и «шероховатый». Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления. Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями; клетки R-форм, образуют цепочки, которые, накладываясь друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии.



Рис. 8.3. Цветовая принадлежность микроорганизмов

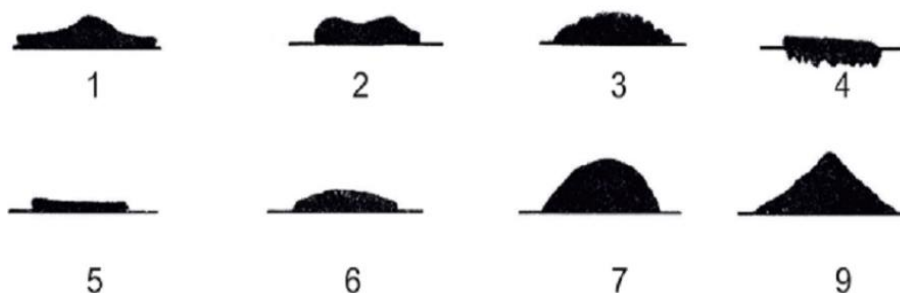


Рис. 8.4. Рельеф (профиль) колонии:

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в агар; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный



Рис. 8.5. Разновидности поверхности микроорганизмов

6. Характер края колоний. Край может быть ровным (гладким); волнистым; локонообразным (нитчатым); лопастным; бахромчатым; зазубренным; корневидным (ветвистым) и др. (рис. 8.6).

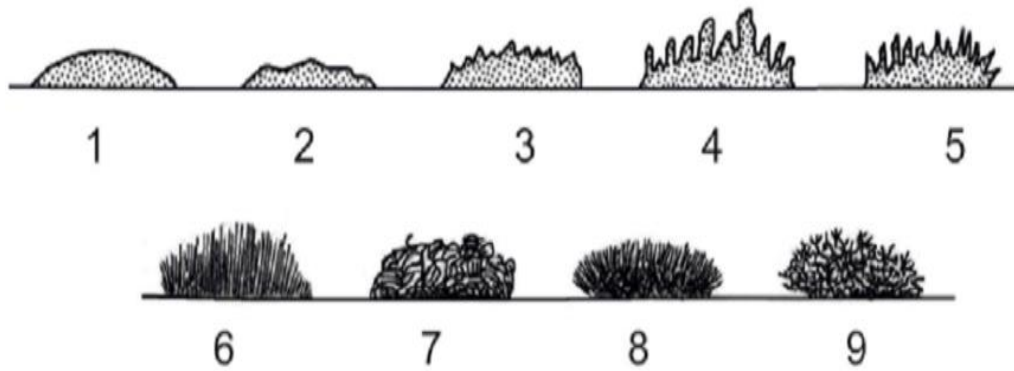


Рис. 8.6. Контур края: 1 – гладкий (S); 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастный; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

7. Прозрачность колоний. Бывают просвечивающие, или прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные бактериальные колонии.

8. Структура колоний. Структура колоний бывает однородная (гомогенная) и неоднородная (гетерогенная). Неоднородные колонии могут быть мелко- и крупнозернистыми (рис. 8.7). У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, структура не определяется.

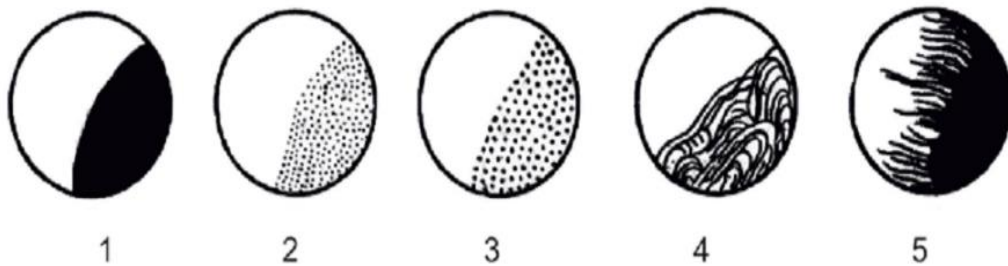


Рис. 8.7. Структура колоний: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

- *глинистые* – бесцветные, прозрачные, без видимой определенной структуры;

- *зернистые*, которые в зависимости от величины зерен разделяются на мелко- и грубо-зернистые;

- *нитевидные или волокнистые*, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии.

Колонии бывают однородные и неоднородные. Строение однородных колоний одинаково во всех частях, у неоднородных колоний центральная часть отличается от периферической или отдельные секторы имеют строение, неодинаковое с остальной массой.

9. Консистенция колоний. Она определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа. Консистенция характеризует физическое состояние колонии. Ее исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей.

По характеру консистенции колонии бывают:

- *пастообразные*, легко снимающиеся и разрывающиеся по поверхности питательной среды, наподобие сливочного масла;

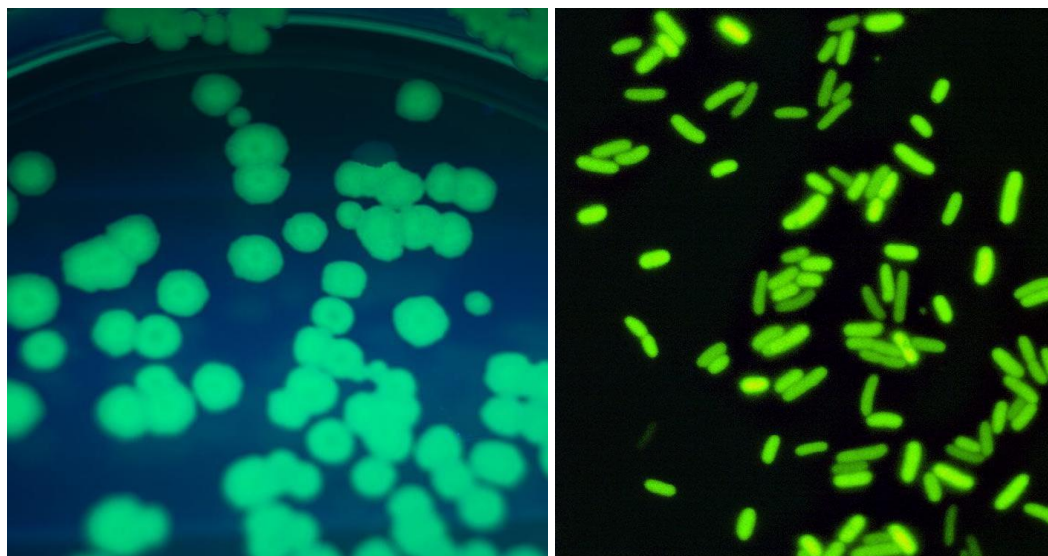
- *вязкие или слизистые*, прилипающие и тянущиеся за петлей;

- *волокнистые или кожистые*, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии;

- *хрупкие*, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

10. Степень погружения в среду. Большинство колоний живет на поверхности субстрата. Однако существуют также глубинные, в виде чечевичек, погруженных в толщу среды, и донные бактерии, образующие пленки на дне сосудов с питательной средой.

11. Люминесценция. Известно также несколько видов аэробных бактерий, способных к фосфоресценции (люминесценции (от лат. *luminis* – свет и *-escent* – суффикс, означающий слабое действие). Их колонии способны до суток светиться желтоватым или зеленоватым цветом. Фотобактерии – жители различных водоемов, встречаются на чешуе и мясе рыбы. Их морфология может быть различной – среди светящихся видов встречаются кокки, вибрионы, палочки (рис. 8.8).



a

б

Рис. 8.8. Люминесцентные виды микроорганизмов: *a* – светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum*; *б* – бактерии *Escherichia coli*

12. Морфология колоний. В жидком субстрате морфология бактериальных колоний характеризуется образованием равномерной мути, пленки или осадка. В полужидких средах при посеве уколами подвижные бактерии вызывают помутнение в толще среды вокруг места посева, а неподвижные – только в самом месте укола. Некоторые бактерии в аэробных

и анаэробных условиях выделяют различные газы (индол, скатол, меркаптан, сероводород, масляная кислота, диэтиловый эфир и т. п.).

Пример описания колоний

Рост микробов на плотной питательной среде. Чашки с посевами просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и исследуют колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения (рис. 8.9).



Рис. 8.9. Рост микроорганизмов на плотной питательной среде

Форма колоний: круглая, овальная, ветвистая, амёбовидная и др.

Размеры колоний определяются их диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии: точечные, мелкие, средние, крупные.

Цвет колоний: определяется пигментом, который продуцирует культура микробов – красный цвет (актиномицеты, дрожжи, бактерии), синий цвет (синегнойная палочка), желтый и золотисто-желтый (стафилококки, сарцины), черный и бурый (грибы, азотобактер и другие микроорганизмы). Большинство патогенных бактерий бесцветны или молочно-мутного цвета.

Рельеф колоний характеризуется приподнятостью их над поверхностью среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Рельеф колонии определяется невооруженным глазом или с помощью лупы при рассмотрении ее сверху и сбоку. Различают колонии: каплеобразные, куполообразные, конусообразные, с вдавленным центром.

Поверхность колоний: ровная или складчатая, матовая или блестящая, сухая или влажная и т. д.

Характер края колоний: ровный, изрезанный, лопастный, локонообразный, бахромчатый и т. д.

Прозрачность колоний: прозрачные или непрозрачные в разной степени.

Консистенция колоний: пастообразная, вязкая, слизистая, волокнистая, плотная, хрупкая, сухая и т. д. Консистенцию колонии определяют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериологической петлей.

Особенности микробного роста на жидких питательных средах.

Поверхностный рост: пристеночное кольцо, нежная пленка, грубая морщинистая пленка, поверхностный рост отсутствует.

Помутнение: слабое, умеренное, сильное, стойкое, отсутствует.

Осадок: плотный, зернистый, вязкий, в виде клочка ваты, в виде хлопьев, крошковатый и т. д.

Количество осадка: обильное, скудное, осадок отсутствует.

Цвет среды: не изменен, изменен (приобретает окраску пигмента, образуемого микроорганизмом).

Газообразование: наличие или отсутствие пузырьков газа.

Рост микробов на полужидких питательных средах.

Форма колоний: круглая, овальная, разветвленная.

Размеры колоний: точечные, средние, крупные.

Края колоний: ровные, разорванные, лопастные, зубчатые.

Поверхность колоний: матовая, блестящая, ровная или складчатая.

Разжижение: быстрое, медленное, отсутствует (рис. 8.10).



Рис. 8.10. Особенности микробного роста на жидких и полужидких питательных средах

Задание 2. Приготовить препараты-мазки из культивированных колоний микроорганизмов, окрасить их по Граму, микроскопировать и зарисовать в тетради.

Контрольные вопросы

1. Перечислите культуральные свойства микроорганизмов.
2. По каким признакам характеризуют колонии микробов?
3. По каким признакам описывают культуральные свойства микроорганизмов, выросших на плотных средах в чашках Петри?
4. Изучение культуральных свойств выросших в чашках колоний на жидких (полужидких) питательных средах.
5. Какая температура необходима для культивирования микобактерий?
6. Размер, форма и рельеф колоний микроорганизмов выращенных на различных питательных средах.
7. Опишите люминесцентную способность микроорганизмов.
8. Цвет, поверхность и структура разнообразных колоний микроорганизмов.
9. Изучение морфологических свойств различных микроорганизмов.

Лабораторное занятие 9. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: изучить методы выделения чистых культур; выделить чистые культуры микроорганизмов из объектов окружающей среды.

Материалы и оборудование: бактериологическая петля и стеклянные шпатели, микробиологические пипетки, восковые карандаши; пробирки, чашки Петри с выросшими культурами, лупа, микроскоп; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего); 96%-ный этиловый спирт; газовые горелки, термостат.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с методами выделения чистых культур микроорганизмов.

Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – потомства микроорганизмов, образовавшегося из одной клетки.

Выделение чистой культуры является важным этапом бактериологического исследования. Чистая культура необходима для изучения основных морфологических, культуральных и биохимических признаков, по совокупности которых определяется видовая принадлежность микроорганизмов.

Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Также чистая культура микроорганизмов необходима для приготовления лечебных сыровороток, профилактических вакцин, диагностических препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, ферментов, антибиотиков, кормового белка и других веществ.

К основным методам выделения чистых культур микроорганизмов относят следующие:

1. *Методы механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред:*

- **метод Коха** (метод глубинного посева);
- **метод Дригальского** (фракционный метод);
- **метод истощающего штриха**.

2. *Метод предельных разведений (метод Пастера).*

3. *Метод применения элективных питательных сред.*

4. *Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ.*

5. *Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов.*

К методам механического разделения микроорганизмов с использованием плотных питательных сред относятся метод Коха и метод Дригальского.

Метод Коха (метод глубинного посева). Исследуемый материал вносят бактериологической петлей в пробирку с расплавленной плотной питательной средой. Равномерно размешивают содержимое пробирки, вращая ее между ладонями. Каплю разведенного материала переносят во вторую пробирку, из второй – в третью и т. д. Содержимое каждой пробирки, начиная с первой, выливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды в чашках их помещают в термостат для культивирования.

Для выделения анаэробных микроорганизмов по методу Коха необходимо ограничить доступ кислорода к культуре. С этой целью поверхность глубинного посева в чашке Петри заливают стерильной смесью парафина и вазелина (1:1). Можно также оставлять посевной материал, тщательно перемешанный с агаризованной средой, непосредственно в пробирке. Чтобы извлечь выросшие колонии анаэробных микроорганизмов, пробирки слегка нагревают, быстро вращая над пламенем горелки. Далее столбик с агаром разрезают стерильным

скальпелем, колонии извлекают стерильной петлей или стерильной капиллярной трубкой и переносят в жидкую среду.

Метод Дригальского основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри. Каждая микробная клетка, фиксируясь в определенном месте, начинает размножаться, образуя колонию.

Для посева по методу Дригальского используют несколько чашек Петри, залитых плотной питательной средой (МПА). На поверхность среды первой чашки наносят пастеровской пипеткой каплю исследуемого материала. Затем с помощью стерильного шпателя эту каплю распределяют по всей питательной среде (**посев газоном**).

Не фламбируя шпатель, быстро переносят его во вторую чашку и распределяют оставшийся на нем материал по всей поверхности агара. Затем этим же шпателем производят посев в третью, четвертую и пятую чашки. Когда посев закончен, шпатель обжигают над пламенем горелки. Чашки маркируют и ставят в термостат вверх дном на 18–24 ч (рис. 9.1).

Посев также можно проводить **штрихом**, используя бактериологическую петлю. Как правило, в первой чашке после культивирования посева появляется рост микробов в виде сплошного налета, в последующих чашках содержание микроорганизмов снижается и образуются изолированные колонии, из которых отсевом можно легко выделить чистую культуру.



Рис. 9.1. Фракционный метод посева *Escherichia coli* на плотную питательную среду

В целях экономии сред и посуды можно пользоваться одной чашкой, разделив ее на секторы, и последовательно засеивать их штрихом (**метод источника штриха**).

Метод предельных разведений (метод Пастера) заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Исследуемый материал разводят в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида. 1 мл исследуемого материала стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл физиологического раствора. Получают разведение 10:1. Из пробирки с разведением 10:1 переносят 1 мл в пробирку с 9 мл физиологического раствора. Получают разведение 10:2. Аналогично готовят последующие разведения: 10:3, 10:4, 10:5 и т. д.

С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура

микроорганизма. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры, так как микробы в жидких средах растут диффузно и при этом изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную питательную среду.

Для получения изолированных колоний из последних разведений культуры делают посе́вы в чашки Петри бактериологической петлей. Чашки подписывают, переворачивают вверх дном и помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 18–24 ч.

Чашки с посевами просматривают, сходные между собой колонии описывают, делают препараты-мазки, окрашивают и микроскопируют. При однородности культуры делают пересев.

Метод применения элективных питательных сред. Не все микроорганизмы растут на простых питательных средах. Для выделения и накопления микробов определенного вида используют элективные, или избирательные, среды.

Элективной средой для молочнокислых бактерий может быть молоко. Плесневые грибы и дрожжи выращивают на средах с содержанием углеводов (пивное сусло, сусло-агар) (рис. 9.2).



Рис. 9.2. Основные питательные среды с содержанием углеводов

Для культивирования микобактерий применяют плотную яично-молочную среду Петраньяни.

На картофельной среде Рушмана выращивают маслянокислые бациллы.

Среда Китта – Тароцци применяется для культивирования анаэробов (рис. 9.3). Делают посе́вы на элективные питательные среды суспензии смешанных бактериальных культур. Культивируют в термостате при температуре 35–37 °С в течение 18–24 ч.



Рис. 9.3. Питательная среда Китта – Тароцци

Метод выделения чистых культур с помощью химических веществ используется при изолировании культур микроорганизмов, устойчивых к определенным химическим веществам. Например, с помощью этого метода можно выделить чистую культуру туберкулезных микобактерий, устойчивых к действию кислот, щелочей и спирта. В этом случае исследуемый материал перед посевом заливают 15%-ным раствором кислоты или антиформинном и выдерживают в термостате в течение 3–4 ч. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы погибают. После нейтрализации обработанный материал высевают на плотную среду и получают изолированные колонии возбудителя туберкулеза.

Биологические методы выделения чистых культур патогенных микроорганизмов основаны на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, восприимчивых к данному виду возбудителя. Если патогенный микроорганизм содержится в исследуемом объекте, то лабораторное животное заболевает и погибает. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посевы на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов.

Задание 2. Выделить чистую культуру микроорганизмов методом Дригальского (рассева) и методом истощающего штриха из объектов окружающей среды. Из культивируемых колоний приготовить мазки, окрасить, микроскопировать, определить видовую принадлежность и зарисовать в тетради.

Контрольные вопросы

1. Понятие «чистая культура».
2. Применение чистых культур в животноводстве, ветеринарии, медицине, народном хозяйстве.
3. Методы выделения чистых культур.
4. Как выделить чистую культуру при бактериологическом исследовании?
5. Элективная среда для культивирования молочнокислых бактерий.
6. Какая температура необходима для культивирования микобактерий?

Лабораторное занятие 10. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Цель занятия: изучить влияние физических, химических и биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов.

Материалы и оборудование: пробирки с культурами микробов (гнилостная микрофлора, молочнокислая микрофлора); мясопептонный агар, мясопептонный агар с глюкозой; чашки Петри, бактериологические петли; 0,1 н. раствор кислоты, 0,1 н. раствор щелочи, 1%-ный раствор хлорной извести; стерильные пинцеты; дистиллированная вода; шпатели, восковые карандаши, газовые горелки, термостаты.

Ход занятия

Задание 1. Изучить влияние факторов внешней среды на жизнедеятельность микроорганизмов.

Микроорганизмы находятся в непрерывном взаимодействии с внешней средой и подвергаются разнообразным ее влияниям. В одних случаях они могут способствовать лучшему развитию микробов, в других – подавлять их жизнедеятельность. Следует помнить, что изменчивость и быстрая смена поколений микробов позволяет им приспособляться к самым разнообразным условиям жизни, быстро закреплять приобретенные признаки и передавать их по наследству. Но микробы не только сами могут изменяться под воздействием внешней среды, но могут изменять и среду в соответствии со своими особенностями. Поглощая в процессе питания и дыхания различные вещества, микроорганизмы выделяют в окружающую среду продукты обмена, которые изменяют ее химический состав, ее реакцию и соотношение в ней различных веществ.

Зная факторы, способствующие развитию микробов и подавляющие их, можно регулировать деятельность микробов (стимулировать развитие полезных и вести борьбу с вредными).

Все факторы внешней среды, оказывающие влияние на микроорганизмы, делят на группы:

1) *физические* (температура, влажность, осмотическое давление, различные формы лучистой энергии, ультразвук, механическое воздействие, токи высокой частоты);

2) *химические* (химический состав питательной среды, реакция питательной среды, окислительно-восстановительный потенциал, влияние антисептических веществ);

3) *биологические* (взаимоотношения микроорганизмов с другими организмами).

Температура. Температура внешней среды является мощным фактором воздействия на микроорганизмы, который определяет не только интенсивность их развития, но и вообще возможность развития. Принято различать три основные температурные точки, имеющие значение для развития микробов: температурный оптимум, минимум и максимум.

По отношению к температурному фактору микроорганизмы делят на три группы – психрофилы (холодолюбивые), мезофилы (развивающиеся при средних температурах) и термофилы (теплолюбивые). Такое деление производят на основе оптимальной температуры развития. Примерные границы температур для различных групп представлены в табл. 10.1.

Таблица 10.1. Температуры для различных групп микроорганизмов, °С

Микроорганизмы	Минимальная	Оптимальная	Максимальная
Психрофилы	-8...-10	+10...+15	+15...+20

Мезофилы	+5...+10	+30...+37	+40...+45
Термофилы	+15...+20	+40...+55	+60...+70

Вышеуказанные температурные границы приведены для размножения микроорганизмов. Для других процессов жизнедеятельности (спорообразование, образование токсинов, пигментов и др.) значения температур для тех же групп микроорганизмов могут быть иными.

Психрофилами называют микроорганизмы, область температур роста которых лежит в пределах от 0 (или ниже) до 20 °С, хотя оптимум составляет 15 °С. Психрофильные микроорганизмы являются обитателями холодных источников, глубоких озер и океанов, хорошо развиваются на продуктах при холодильном хранении (рис. 10.1). Наиболее сильной устойчивостью к низким температурам обладают плесневые грибы и гнилостные бактерии (-3...-9 °С).



Рис. 10.1. Психрофильные микроорганизмы: *а* – свечение психрофильных бактерий рода *Photobacterium*; *б* – сальмонелла (*Salmonella* spp.)

Мезофилы живут при средних температурах. Это самая распространенная группа микроорганизмов (бактерии, плесневые грибы, дрожжи). Мезофилами являются все патогенные и условно-патогенные микроорганизмы и большинство сапрофитных (рис. 10.2).

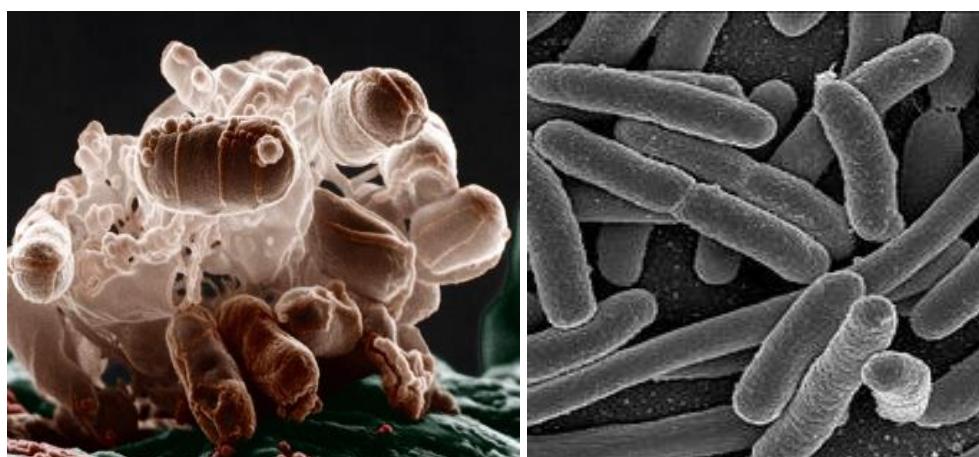
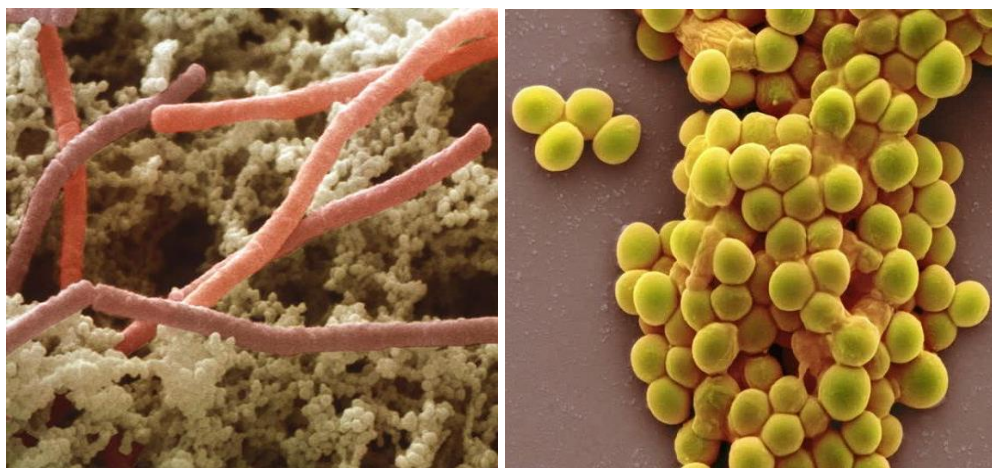


Рис. 10.2. Кишечная палочка (*Escherichia coli*)

Термофилы развиваются при высоких температурах (рис. 10.3). Они в большом количестве встречаются в почве, сточных водах и навозе, в гейзерах, песках пустынь. Они участвуют в ряде биологических процессов: при самосогревании влажного сена и хлопка, силосовании кормов, вызывают порчу пастеризованных и стерилизованных продуктов. Знание отношения разных видов микробов к воздействию температур позволяет культивировать их в лабораториях на искусственных питательных средах. При этом учитывают значения оптимальных для каждого вида микробных клеток температурных режимов (в термостатах).



a

б

Рис. 10.3. Термофильные микроорганизмы: *a* – болгарская палочка (*Lactobacillus bulgaricus*); *б* – термофильный стрептококк (*Streptococcus thermophilus*)

Влажность. Микроорганизмы могут развиваться только в субстратах, имеющих свободную воду и в количестве не менее определенного уровня. С понижением влажности субстрата интенсивность размножения микробов замедляется, а при удалении воды из субстратов ниже необходимого уровня вообще прекращается. Потребность во влаге у различных микроорганизмов колеблется в широких пределах. По величине минимальной потребности во влаге для роста различают следующие группы: гидрофиты (влаголюбивые), мезофиты (средневлаголюбивые), ксерофиты (сухлюбивые). Гидрофитами являются большинство бактерий, а мицелиальные грибы и дрожжи – мезофиты, но имеются среди них и гидрофиты.

Большинство бактерий способно развиваться в субстратах при равновесной относительной влажности воздуха в пределах не ниже 95–90 %. Для дрожжей минимум в субстрате соответствует 90–85 % относительной влажности воздуха, для большинства мицелиальных грибов – 80 %, а для некоторых ксерофитных видов пределом является относительная влажность воздуха 75–65 %.

Лучистая энергия. Различные формы лучистой энергии оказывают на микроорганизмы разнообразное физическое, химическое и биологическое действие. Биологическое действие излучения зависит от длины волны, чем она короче, тем в ней больше заключено энергии, тем сильнее воздействие на организм. В основе действия лежат физические и химические изменения, происходящие в клетках микроорганизмов и в окружающей среде.

Солнечный свет обладает наибольшим потенциалом вредного воздействия на микроорганизмы. Способностью использовать энергию солнечного света обладают лишь пигментообразующие формы бактерий. Микроорганизмы, не имеющие пигмента, погибают под действием прямых солнечных лучей. Рассеянный солнечный свет подавляет их развитие постепенно. Однако развитие многих мицелиальных грибов при постоянном отсутствии света протекает ненормально, хорошо развивается только мицелий, а спорообразование тормозится. Под влиянием солнечных лучей происходят внутриклеточные химические реакции с

образованием гидроксильных радикалов и других высокореактивных веществ, действующих губительно на микробную клетку.

Микроорганизмы более устойчивы к излучениям, чем высшие животные и растительные организмы. Дрожжи и плесени более устойчивы, чем бактерии. Споры бацилл и клостридий выносливее их вегетативных форм. Чувствительны к облучению кишечная палочка, протей, многие бактерии рода псевдомонас (распространенные возбудители порчи сырья и мясных и рыбных продуктов). Микрококки отличаются повышенной устойчивостью. Установлено, что микроорганизмы способны восстанавливать лучевые повреждения, что определяется видовыми особенностями микроорганизмов и их физиологическим состоянием.

Радиоволны. Короткие электромагнитные волны длиной от 10 до 50 м, ультракороткие длиной от 10 м до миллиметров обладают стерилизующим эффектом. При прохождении коротких и ультракоротких радиоволн через среду возникают переменные токи высокой частоты (ВЧ) и сверхвысокой частоты (СВЧ).

Сверхвысокочастотную электромагнитную обработку пищевых продуктов все шире применяют в общественном питании (для варки, сушки, выпечки, при разогревании и др.).

Давление и механическое сотрясение. Микроорганизмы не испытывают значительных изменений под влиянием даже очень больших давлений, но есть группы микроорганизмов, которые развиваются только при избыточных давлениях. Их называют барофильными (в глубинах морей и океанов). К механическим сотрясениям они чувствительны, если они сильные и длительные. Так, самоочищение бурных рек происходит в результате гибели микроорганизмов под воздействием сильных толчков воды.

Ультразвук. Ультразвуком называют механические колебания с частотами более 20000 колебаний в секунду (20 кГц). Колебания такой частоты находятся за пределами слышимости человека. Ультразвуковые волны могут распространяться в твердых, жидких и газовых средах. Обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. Механизм бактерицидного действия ультразвука объясняется двумя теориями: кавитационно-механической и кавитационно-электрохимической. Согласно первой теории считают, что ультразвуковые волны, распространяясь в упругой среде, вызывают в ней попеременные сжатия и разрежения. В клетке создаются огромные давления, достигающие десятков и сотен мегапаскалей, что вызывает механическое разрушение цитоплазматических структур и гибель клетки (кавитация).

К **химическим факторам**, влияющим на жизнедеятельность микробов, относят: химический состав питательной среды, реакцию среды, окислительно-восстановительный потенциал среды и действие ядовитых (антисептических) веществ.

Микроорганизмы приспособились к определенной среде обитания. Большинство микробов предпочитает среду, в которой концентрация водородных ионов ближе к нейтральной (рН 6,5–7,5).

К самым устойчивым к кислой среде относятся плесневые грибы, многие из них характеризуются ацидотолерантностью и способностью роста в широких пределах рН (от 2 до 11).

Оптимальная рН для нейтральнофильных микроорганизмов находится в пределах 7,0. Типичными представителями нейтрофилов являются бактерии группы кишечных палочек (БГКП), стрептококки, бациллы, сальмонеллы и большинство других патогенных микроорганизмов.

Растворы щелочей и кислот оказывают бактерицидное действие на микроорганизмы, вызывают денатурацию белков, разрушают углеводы. Растворы хлорной извести окисляют компоненты микробной клетки, в результате наступает ее гибель. Формалин – 40%-ный водный раствор формальдегида – вызывает денатурацию белков, губительно действует на все формы микроорганизмов.

Для консервирования полуфабрикатов из плодово-ягодного сырья, рыбных консервов, кетовой икры используют бензойную кислоту и ее натриевую соль. В качестве консерванта для многих пищевых продуктов все чаще применяют сорбиновую кислоту и ее соли.

Для борьбы с картофельной болезнью хлеба, для предотвращения его плесневения рекомендуется введение в тесто солей пропионовой кислоты. Этот консервант можно применять и для некоторых рыбных продуктов.

Под **биологическими факторами** понимают влияние на жизнедеятельность микроорганизмов других видов и групп микробов, а также животных и растений, составляющих в природных условиях специфический биоценоз. В связи с этим между микроорганизмами и другими живыми организмами существуют разнообразные взаимоотношения: симбиоз, комменсализм, метабиоз, сателлизм, синергизм, антагонизм, паразитизм и др.

Мутуализм (взаимовыгодный симбиоз) представляет собой сожительство, благоприятное для обоих симбионтов, совместно они развиваются даже лучше, чем каждый в отдельности. Примером может служить совместное развитие молочнокислых бактерий и дрожжей (в кефирных грибах) (рис. 10.4). Симбиотические взаимоотношения этих микроорганизмов используют в процессе изготовления некоторых молочнокислых продуктов (кефира, кумыса).

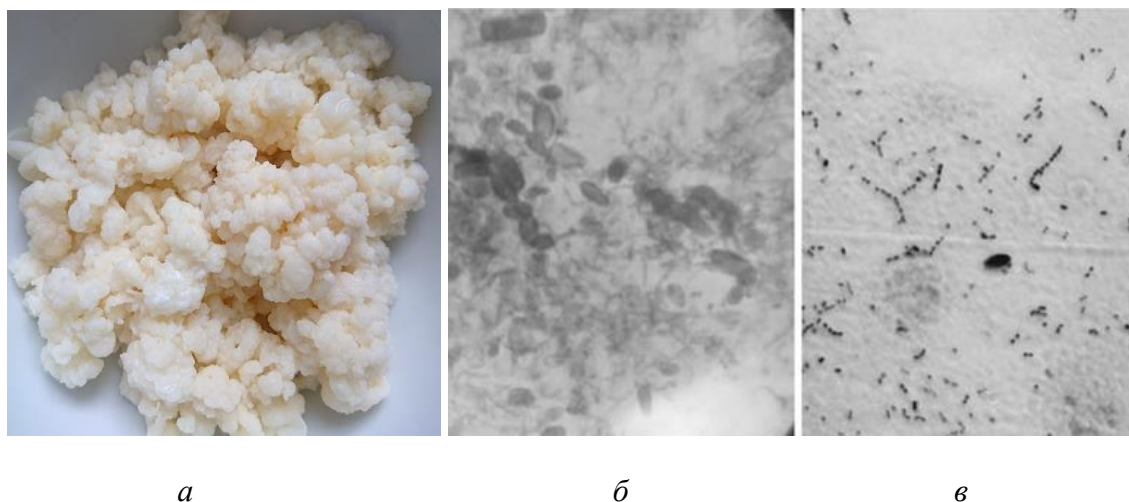


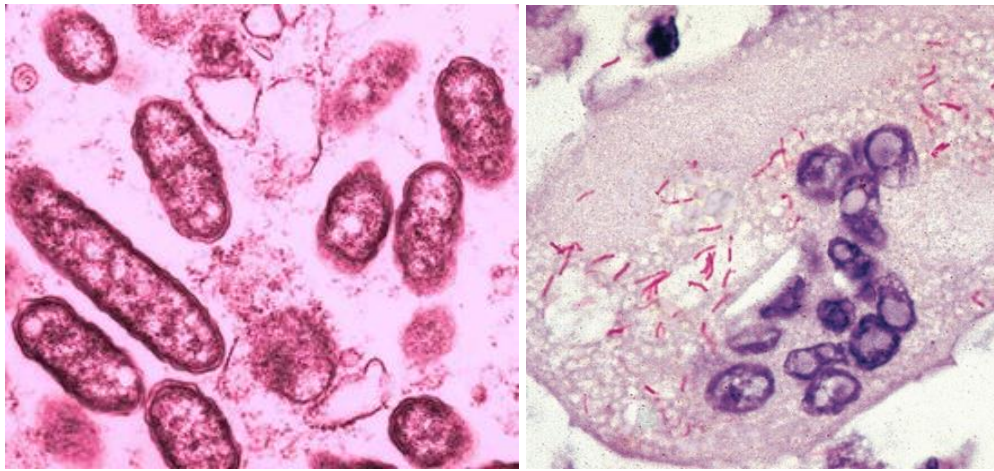
Рис. 10.4. Кефирный грибок (а), микропрепараты расплава кефирного грибка (б), кефирной закваски (в)

Синергизм – содружественное действие двух или нескольких видов, когда при совместном развитии усиливаются отдельные физиологические функции. Например, повышается синтез определенных веществ (образование ароматических веществ лактококками) при совместном выращивании с молочнокислыми стрептококками.

Комменсализм – тип взаимоотношений между двумя организмами, при котором один живет за счет другого, не принося заметной пользы и не причиняя вреда. Такие взаимоотношения наблюдаются между молочнокислыми бактериями, а также кишечными палочками и организмом человека или животного.

Метабиоз – такой вид взаимоотношений, когда продукты жизнедеятельности одного микроорганизма являются продуктами питания других. Так, дрожжи, сбраживая сахар в этиловый спирт, создают условия для развития уксуснокислых бактерий, а образуемая последними уксусная кислота используется плесенью.

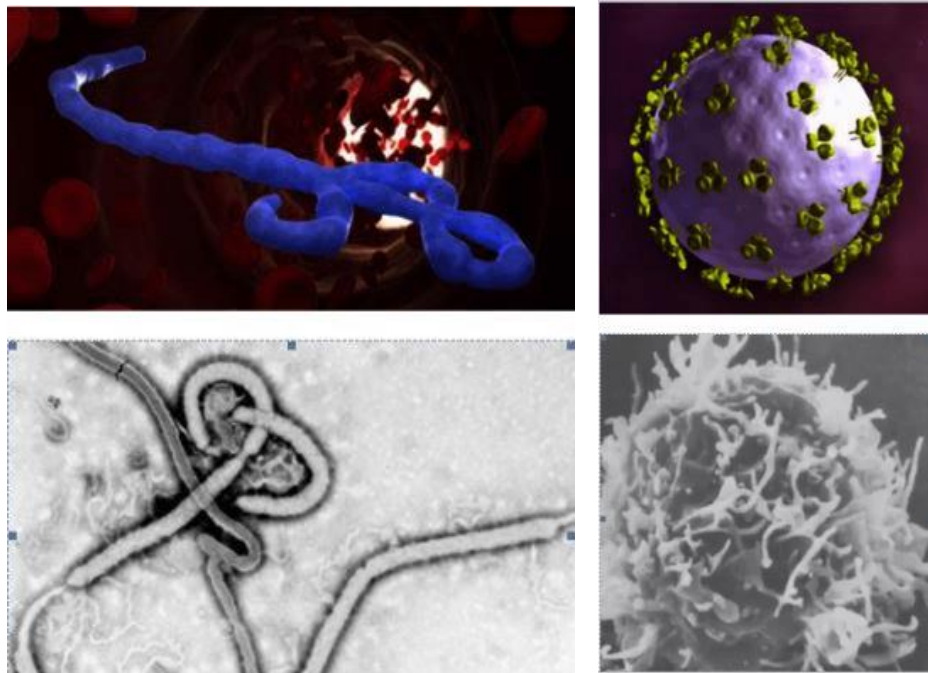
Паразитизм – вид взаимоотношений, при котором один из микроорганизмов (паразит) живет за счет другого (хозяина), причиняя ему вред. Паразитами являются все патогенные микроорганизмы по отношению к человеку, животному и растениям. Абсолютными паразитами являются риккетсии (рис. 10.5) и вирусы (рис. 10.6), развивающиеся внутри клеток макро- и микроорганизмов.



a

б

Рис. 10.5. Риккетсии, одни из самых маленьких по размеру бактерии (*Rickettsia*):
a – изменения формы риккетсий в зависимости от условий окружающей среды;
б – множество видов *Rickettsia*



a

б

Рис. 10.6. Патогенные микроорганизмы: *a* – вирус Эбола;
б – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)

Антагонизм (антибиоз) – тип взаимоотношений между микроорганизмами, при котором одни микроорганизмы подавляют развитие других. Причин антагонизма может быть несколько: истощение питательного субстрата вследствие более быстрого развития одного из микроорганизмов; изменение pH среды; выделение в среду микробами-антагонистами антибиотиков.

Задание 2. Определить отношение микроорганизмов к температуре и наличию кислорода. Установить влияние химических и биологических факторов на рост и развитие микроорганизмов. Полученные результаты зарисовать в тетради.

Для определения микроорганизмов по отношению к температуре засевают ряд чашек Петри с питательной средой исследуемой культурой микробов. Чашки помещают в термостат для культивирования при различных температурах: 10–15, 15–20, 20–37, 37–45, 45–55 °С. Ведут наблюдения за интенсивностью роста, развитием микробов при различных температурах и определяют принадлежность микроорганизмов по отношению к температуре.

Для определения отношения бактерий к наличию кислорода делают посевы в агаризованную среду с глюкозой. Посевной материал помещают в чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до температуры 40–45 °С агаром. Равномерно распределяют и дают застыть. Затем чашки Петри переворачивают, помещают в термостат при температуре 37 °С на 72 ч и просматривают, анализируя характер роста.

Аэробы растут на верхнем слое среды, факультативные анаэробы развиваются по всей среде, а строгие анаэробы – в глубине среды.

Определение влияния растворов щелочи, кислоты и хлорной извести на микроорганизмы. В стерильные чашки Петри заливают по 12 мл расплавленного МПА, затем поверхность среды равномерно засевают исследуемой культурой микробов. Чашки помещают на 15–20 мин в термостат для подсушивания. После маркировки дна чашек на поверхность культур последовательно вносят пипеткой по 1–2 капли раствора щелочи, кислоты, хлорной извести. Далее чашки для инкубации микрофлоры помещают в термостат при температуре 35 °С на 24–48 ч. После культивирования определяют влияние химических веществ на рост и развитие микроорганизмов.

Для определения антагонизма между гнилостной и молочнокислой микрофлорой необходимо на мясопептонный агар в чашку Петри петлей сделать два посева: один – из пробирки с культурой аммонификаторов, другой – с культурой молочнокислых микроорганизмов. Затем чашку с посевами помещают в термостат при температуре 35–37 °С на 72 ч. При наблюдении за характером роста культур отмечают антагонизм между гнилостными и молочнокислыми микроорганизмами.

Контрольные вопросы

1. Назовите физические факторы внешней среды.
2. Как определяют действие физических и химических факторов на микроорганизмы?
3. Зависимость выживаемости клеток от состава среды.
4. Взаимоотношение микробов с другими живыми организмами.
5. Как определить отношение микроорганизмов к наличию кислорода?
6. Отношение микроорганизмов к температуре.
7. Как определить антагонизм между гнилостной и молочнокислой микрофлорой?

Лабораторное занятие 11. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ И ФИТОНЦИДАМ

Цель занятия: изучить классификацию антибиотиков по происхождению; определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и фитонцидам.

Материалы и оборудование: пробирки с культурами микробов; мясопептонный агар; чашки Петри, бактериологические петли; набор бумажных дисков, пропитанных различными антибиотиками (пенициллин, ампициллин, оксациллин, стрептомицин, левомицетин и др.); стерильные пинцеты; дистиллированная вода; шпатели, восковые карандаши, газовые горелки, термостаты.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с классификацией антибиотиков по происхождению.

Антибиотики – это специфические соединения, способные в незначительных количествах избирательно задерживать рост микробов или убивать их. Антибиотические вещества образуются микроорганизмами: актиномицетами, плесневыми грибами, бактериями, а также растениями и животными. Термин «антибиотик» был предложен в 1942 г. З. А. Ваксманом для обозначения веществ, образуемых микроорганизмами и обладающих антимикробным действием. Впоследствии многие исследователи предлагали свои формулировки, вкладывая в них подчас слишком ограниченное содержание либо чрезмерно расширяя это понятие.

Антибиотики незаменимы при остром развитии болезни – ангины и пневмонии, а также при инфекционном воспалении, которое локализуется в закрытых полостях (отит, гайморит, остеомиелит, абсцесс, флегмона). Часто приходится назначать антибиотики людям после хирургических операций.

Без применения антибиотиков нередко развиваются серьезные осложнения. Например, если лечение пневмонии или гайморита прошло без участия этих препаратов, могут возникнуть хронические вялотекущие заболевания.

Антибиотики позволили успешно бороться со многими инфекциями и кишечными расстройствами, неизбежными в промышленном животноводстве и птицеводстве. Они заметно улучшили привесы, конверсию корма и повысили сохранность поголовья.

Антибиотики занимают особое место в современной медицине. Они являются объектом изучения различных биологических и химических дисциплин. Наука об антибиотиках развивается бурно. Если это развитие началось с микробиологии, то теперь проблему изучают не только микробиологи, но и фармакологи, биохимики, химики, радиобиологи, врачи всех специальностей.

По происхождению антибиотики подразделяют на группы:

- антибиотические вещества, продуцируемые актиномицетами, плесневыми грибами, бактериями, организмом животного или человека;
- антибиотики растительного, синтетического и полусинтетического происхождения.

Антибиотики актиномицетного происхождения – стрептомицин, тетрациклины (рис. 11.1), неомицин, нистатин – обладают широким антибактериальным спектром действия. Они активны в отношении грамположительных бактерий, возбудителей туберкулеза, брюшного тифа, туляремии, бруцеллеза, сальмонеллез и др.



Рис. 11.1. Антибиотики актиномицетного происхождения

Наиболее активными продуцентами антибиотиков являются *мицелиальные грибы*. Плесень рода *Penicillium* продуцирует широко используемый пенициллин (рис. 11.2). Он обладает бактерицидным действием главным образом на грамположительные стафилококки и стрептококки. Плесени рода *Aspergillus* выделяют антибиотики – фумингацин и аспергиллин. *Mucor* продуцирует клавицин.



Рис. 11.2. Плесень рода *Penicillium*, продуцирующая антибиотик пенициллин

К антибиотикам, продуцируемым бактериями, относят грамицидин, пиоцианин, субтилин, полимиксин (рис. 11.3). Эффективность бактериальных антибиотиков ниже, чем антибиотиков грибного и актиномицетного происхождения, однако они способны подавлять развитие возбудителя туберкулеза, маслянокислых бактерий, кишечных палочек, стафилококков и других видов молочнокислых бактерий.



Рис. 11.3. Антибиотики, продуцируемые бактериями

К антибиотическим веществам животного происхождения относят лизоцим, эритроин, экмолин и интерферон (рис. 11.4). Лизоцим содержится в яичном белке, слезах, слюне, молозиве, молоке. Экмолин получают из тканей рыб. Он активен в отношении стафилококков и стрептококков.



Рис. 11.4. Антибиотические вещества животного происхождения

Антимикробные вещества высших растений называют *фитонцидами*. Наиболее сильной бактерицидностью обладают фитонциды лука, чеснока, хрена, горчицы, алоэ, крапивы, можжевельника, почек березы, листьев черемухи и др. (рис. 11.5).



Рис. 11.5. Фитонциды растительного происхождения

Антимикробное действие фитонцидов обусловлено продуктами жизнедеятельности растительных организмов: эфирных масел, глюкозидов, органических кислот, дубильных веществ, смол и др.

Полусинтетические антибиотики получают химическим путем. Они имеют широкий спектр действия, активны в отношении не только грамположительных, но и грамотрицательных микроорганизмов (исключение составляет синегнойная палочка). Синтезированы полусинтетические пенициллины (оксациллин, ампициллин (рис. 11.6), карбенициллин), цефалоспорины (цефалоредин), тетрациклины (метацилиногидрохлорид) и др.



Рис. 11.6. Синтезированный полусинтетический ампициллин

Химическая природа антибиотиков различна. Они отличаются химической структурой и биологическими свойствами. Антибиотические вещества из бактерий являются полипептидами, а выделенные из актиномицетов и грибов относятся к сложным циклическим соединениям.

В целях наиболее эффективного использования антибиотиков при лечении различных по своей этиологии заболеваний, уменьшения их побочного действия на организм и снижения выработки устойчивости к ним у патогенных микроорганизмов необходимо соблюдать следующие **принципы антибиотикотерапии**:

- 1) антибиотик должен обладать выраженным специфическим действием на возбудителя с учетом его чувствительности;
- 2) при назначении препарата в установленной терапевтической дозе следует соблюдать кратность применения;
- 3) способ введения антибиотика в организм животного должен обеспечивать проникновение в патологический очаг и полное его всасывание;
- 4) препарат должен длительно сохраняться в различных тканях или органах в необходимой дозировке (количестве);
- 5) антибиотик необходимо назначать до полного выздоровления животного и стремиться к более раннему его применению;
- 6) при лечении животных следует отдавать предпочтение комбинированному типу применения антибиотиков между собой и с другими препаратами.

Однообразное длительное применение одних и тех же антибиотиков без соблюдения курса лечения, занижение дозы, применение без учета чувствительности может привести к негативным явлениям.

Для того чтобы антибактериальная терапия была эффективной и рациональной, идеальным является применение антимикробного препарата, наиболее активного в отношении установленного возбудителя. Необходимо решить, какие антибактериальные средства предпочтительны, определить дозу и схему применения препарата, а также метод введения (пероральный или парентеральный).

В настоящее время ведутся активные работы по изысканию антибиотиков нового поколения, эффективных при лечении вирусных и раковых заболеваний.

Задание 2. Провести эксперимент по определению чувствительности бактерий к

антибиотикам методом бумажных дисков и фитонцидам. Полученные результаты зарисовать в тетради.

Определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков основано на диффузии антибиотика в питательную среду. Бактерии исследуемого штамма (0,1 мл суспензии, находящейся в стационарной стадии роста) высевают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри и распределяют шпателем. Чашку помещают в термостат на 15–20 мин для подсушивания. Дно чашки восковым карандашом делят на сектора и маркируют. Затем стерильным пинцетом на засеянную поверхность помещают на равном расстоянии друг от друга, от краев и центра чашки стандартные бумажные диски, пропитанные растворами различных антибиотиков, выпускаемые промышленностью.

Чашки с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при температуре 37 °С, после чего производят учет действия антибиотиков по величине зон задержки роста вокруг дисков. Результат описывают и зарисовывают в тетради.

В том случае если изучаемые бактерии чувствительны к данному антибиотику, вокруг дисков образуется зона задержки роста. Чем сильнее действие антибиотика на микроорганизм, тем шире будет зона задержки роста (рис. 11.7).

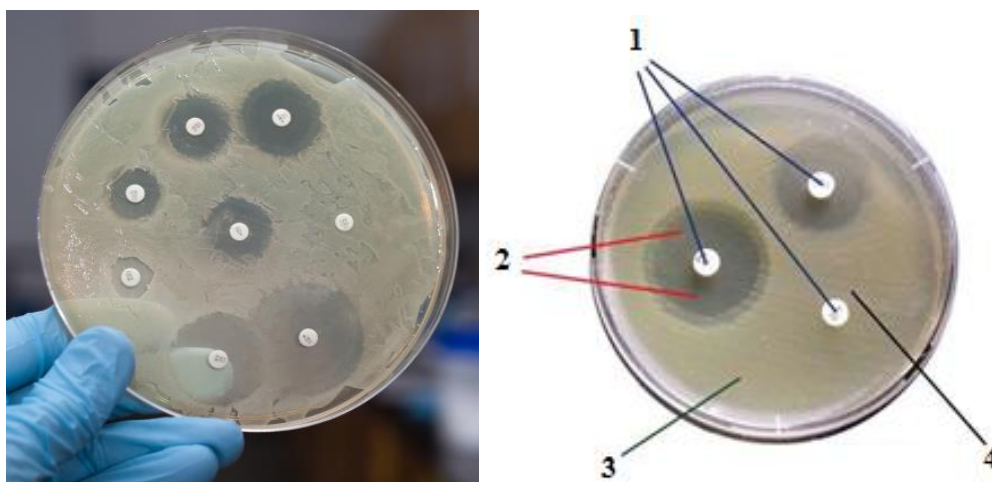


Рис. 11.7. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом бумажных дисков: 1 – бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками; 2 – зона отсутствия роста бактерий (чувствительность микробов); 3 – микробы на питательной среде; 4 – активный рост микробов около диска с антибиотиком (резистентность микробов)

Диаметр зоны задержки роста соответствует степени чувствительности исследуемого микроорганизма к данному антибиотику.

Контрольные вопросы

1. Что такое антибиотики? Назовите известные вам антибиотики.
2. Применение антибиотиков в животноводстве.
3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
4. На чем основано определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков?
5. Назовите основные фитонциды, применяемые в животноводстве.

Лабораторное занятие 12.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: изучить биохимические (протеолитические, сахаролитические окислительно-восстановительные, аутолитические и патогенные) свойства микроорганизмов.

Материалы и оборудование: питательные среды (среда Гисса, среда Эндо; молоко с метиленовым голубым); культура микроорганизмов; бактериологические петли; реактив Несслера; фильтровальная бумага, обработанная раствором уксуснокислого свинца; фильтровальная бумага, обработанная горячим насыщенным (12%-ным) водным раствором щавелевой кислоты; набор красок для окрашивания микроорганизмов; газовые горелки, восковые карандаши, микроскопы, термостат.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с методами изучения биохимических свойств микроорганизмов.

Изучение биохимических свойств бактериальных культур дает возможность разделять их с помощью специальных питательных сред, выяснять видовую принадлежность, разделять на штаммы. Это особенно актуально для молочнокислых бактерий, чистые культуры которых широко применяются в пищевой промышленности.

Кроме изучения формы бактерий, размеров, подвижности, отношения к окраске по Граму, характера роста на простых питательных средах, большое значение для определения их видовой принадлежности имеет изучение биохимических свойств бактерий.

Биохимические свойства микроорганизмов – это способность производить расщепление и синтез различных химических веществ с помощью своих же ферментов.

Для описания биохимических свойств бактериальных культур используется рабочая классификация по конечным продуктам и результатам работы ферментов. Поскольку ферментный состав клеток молочнокислых и других бактерий зависит от их генома, он является относительно постоянной величиной. Поэтому методы определения активных ферментов позволяют классифицировать колонии и определять их видовую принадлежность. Различают пять групп ферментативной активности бактериальных культур:

- протеолитические;
- сахаролитические;
- окислительно-восстановительные;
- аутолитические;
- патогенные (вирулентные).

В жизнедеятельности микробов ферменты играют большую роль. Они являются обязательными участниками разнообразных биохимических реакций, лежащих в основе функций питания, дыхания, размножения. По характеру связи с цитоплазматическими структурами и по месту проявления своего действия ферменты делятся на внутриклеточные и внеклеточные. Каждый вид микроорганизмов продуцирует постоянный для него набор ферментов, одни из которых расщепляют в разной степени белки и углеводы, а другие вызывают окисление и восстановление различных субстратов.

Продуктами деятельности бактериальных культур могут являться различные кислоты (например, молочная и масляная кислоты, выделяемые молочнокислыми бактериями), газы (углекислый, водород, сероводород), индол и др. (рис. 12.1).



Рис. 12.1. Разнообразие продуктов деятельности бактериальных культур

Современные методы позволяют выделить основные факторы патогенности бактериальных культур. Одним из таких факторов является наличие в бактериальной клетке таких ферментов, как гиалуронидаза (рис. 12.2), лецитиназа, нейраминидаза, плазмокоагулаза, и некоторых других.

Уникальные биохимические свойства некоторых бактериальных ферментов обусловили их широкое применение в биологических исследованиях. Так, например, в медицине широко применяются протеолитические и аутолитические ферменты, а в молекулярной генетике и генной инженерии – рестриктазы и лигазы, разрезающие и сшивающие цепочки нуклеиновых кислот.



Рис. 12.2. Гиалуронидаза – фермент бактериальной клетки

Протеолитические свойства микроорганизмов. Протеазы катализируют расщепление белков. В результате расщепления молекулы белка образуются высокомолекулярные промежуточные продукты распада – пептоны, альбумозы и полипептиды. Под действием других протеолитических ферментов пептоны, в свою очередь, расщепляются на полипептиды (соединения двух или нескольких аминокислот) и отдельные аминокислоты.

Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру микроба засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок. Чаще всего для этой цели применяют желатин, реже – свернутую лошадиную сыворотку, коагулированный яичный белок, молоко или кусочки вареного мяса (рис. 12.3).



Рис. 12.3. Питательные среды для посева белковых веществ

При росте в молоке микроорганизмы (некоторые виды кокков и палочек), вырабатывающие протеолитические ферменты, через несколько дней вызывают пептонизацию молока (растворение сгустков казеина и просветление).

Протеолитическая активность одного и того же микроба при определении ее на разных питательных средах будет проявляться неодинаково, что обусловлено специфичностью ферментов. Поэтому под действием некоторых видов бактерий образуются конечные продукты распада – индол, сероводород, аммиак. Для обнаружения этих продуктов производят посев изучаемого микроба на мясопептонный бульон или пептонную воду и после 2–3-суточного выдерживания в термостате исследуют с помощью соответствующих реактивов.

Сахаролитические свойства микроорганизмов. Под действием сахаролитических ферментов бактерий сахара расщепляются на альдегиды и кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются газообразные вещества: CO_2 и H_2 . Характерно, что различные виды и даже разновидности микробов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды, содержащие различные углеводы (лактозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, маннит и др.) и индикатор (нейтральный красный, лакмус, фуксин основной и др.).

Наиболее распространенной является среда Гисса (рис. 12.4), которая представляет собой смесь сахара и индикатора в пептонной воде. Для улавливания газа на дно пробирки со средой опускают «поплавок» – трубочку диаметром 0,5–0,7 см, запаиваемую с одного конца. «Поплавок» помещают запаиваемым концом кверху; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в «поплавке», вследствие чего у запаиваемого конца его собирается воздушный пузырек. При этом разложение микроорганизмами того или иного углевода сопровождается цветной реакцией благодаря присутствию индикатора в питательной среде.

В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности.

Таким образом, при изучении сахаролитических ферментов, выделяемых микробами, учитывают не только явления расщепления тех или иных сахаров по кислотообразованию, но и глубину ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов.



Рис. 12.4. Питательная среда Гисса

Окислительно-восстановительные свойства микробов. В культуре микробов могут быть обнаружены окислительно-восстановительные ферменты, связанные главным образом с дыхательной функцией микроорганизма.

Как известно, процесс окисления субстрата может происходить посредством присоединения к нему кислорода с участием ферментов оксидаз или в результате отщепления от него водорода с участием ферментов дегидрогеназ. Для этого типа реакции характерно то, что окисление какого-либо одного вещества всегда сопровождается восстановлением (редукцией) другого органического вещества. Первое вещество, от которого отщепляется водород, называют донатором, а то вещество, к которому он присоединяется, – акцептором.

Акцептором водорода чаще всего является кислород воздуха, однако им могут быть также многие органические соединения, способные легко окисляться и восстанавливаться.

С целью выявления ферментов дегидрогеназ и определения их активности в практике микробиологических исследований предложен метод, основанный на введении в питательную среду органической краски, выполняющей роль акцептора водорода. В результате присоединения водорода краситель восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение, называемое лейкобазой. При обильном доступе кислорода оно может вновь окислиться и приобрести прежний цвет.

В качестве акцептора водорода используют метиленовый синий, лакмусовую настойку, малахитовый зеленый, индигокармин, нейтральный красный и др. (рис. 12.5).



Рис. 12.5. Органические красители

Один и тот же вид микроба ведет себя неодинаково по отношению к краскам разного состава. Это свойство микроба использовано в микробиологической практике в качестве

дифференциального признака. Бактерии брюшного тифа редуцируют метиленовый синий, но не редуцируют лакмуса и не изменяют нейтрального красного в противоположность кишечной палочке, которая остается нейтральной в отношении метиленового синего, но восстанавливает лакмус и нейтральный красный.

Аутолитические свойства микробов. *Трупный аутолиз* – это самопереваривание (саморасплавление) тканей протеолитическими ферментами без участия микробов. После наступления смерти организма в течение некоторого времени продолжается выработка ферментов и их активное действие на ткани, которые подвергаются аутолизу. Аутолиз, развивающийся неравномерно и неодинаково в органах и тканях, вызывается гидролитическими ферментами, которые приводят к развитию процессов переваривания и растворения клеточных групп.

В свою очередь ряд внешних и внутренних условий определяет сроки появления и развития аутолитических процессов в трупе. К внешним условиям относятся температура и влажность окружающей среды, к внутренним – прижизненное состояние организма, возраст, особенности танатогенеза, причина смерти. Для развития аутолиза наиболее благоприятной является температура 37 °С. Таким образом, низкая температура задерживает аутолиз, а высокая, наоборот, его ускоряет и способствует гниению. В теплой и влажной среде аутолитические процессы протекают быстрее и развиваются раньше. Отечность тканей и избыточное количество жира ускоряют аутолиз.

В коротком агональном периоде аутолитические процессы выражены более резко, чем при продолжительной агонии. Разложение тканей ферментами может происходить уже во время агонии. Слабые кислоты ускоряют, а щелочи тормозят аутолиз. Ткани, обедненные кислородом, снижают сопротивляемость к действию ферментов.

Аутолиз в органах и тканях прекращается с началом гниения. Морфологические признаки аутолиза весьма разнообразны. Они проявляются набуханием органов и тканей, увеличением их в размерах, дряблостью, тусклостью, пропитыванием кровянистым пигментом, размягчением и разжижением тканей, давая сходство с некоторыми заболеваниями или отравлениями едкими ядами. С первыми проявлениями аутолиза встречаются во время осмотра глаз на месте происшествия. Особенно резко процессы аутолиза бывают выражены в желудочно-кишечном тракте.

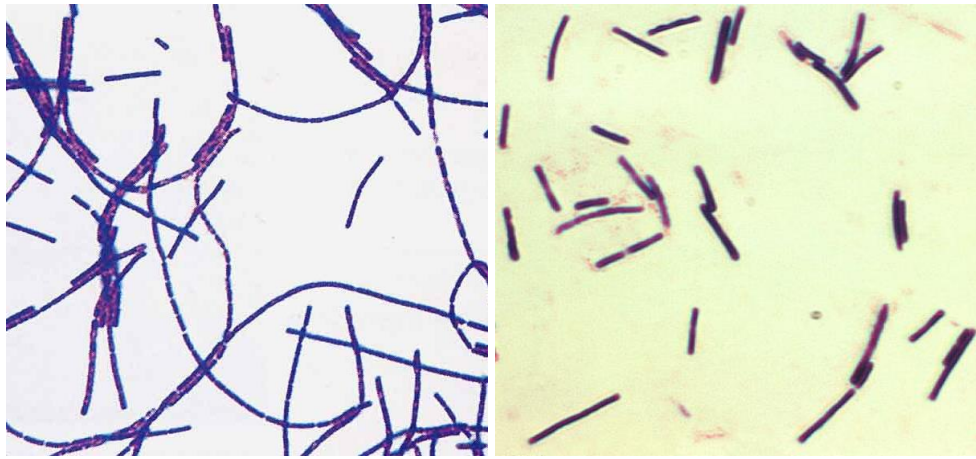
Исключить действие деструктивных ядов и болезненных процессов помогает исследование аутолиза, который является достоверным признаком смерти, позволяет устанавливать давность смерти на месте происшествия с точностью до 6–8 ч.

Патогенные свойства микроорганизмов. *Патогенность* – это потенциальная способность микроорганизмов определенного вида при соответствующих условиях вызывать заболевания. Виды микроорганизмов, которые обладают этим свойством, относят к патогенным (болезнетворным); микробы, не обладающие этим свойством, являются непатогенными – сапрофитами. Наряду с патогенными существуют условно-патогенные микроорганизмы, обитающие на коже, в кишечнике, дыхательных путях, мочеполовых органах. Они также способны вызывать инфекционный процесс, но при наличии дополнительных условий (большая инфицирующая доза, снижение иммунитета и др.).

В естественных условиях заражение макроорганизма происходит через пищеварительный тракт (алиментарный путь), когда в пищу или в воду попадают патогенные микроорганизмы. Вирулентные микроорганизмы могут проникать через поврежденные, а при некоторых инфекционных болезнях (бруцеллез) и неповрежденные слизистые оболочки рта, носа, глаз, мочеполовых путей и кожу.

К основным источникам и переносчикам заразного начала относится в первую очередь больной организм, почва, вода, воздух, навоз, молоко, мясо и корм. От больного могут заражаться люди, животные.

Почвенные инфекции – это такие болезни, при которых заражение происходит в результате попадания патогенных микробов из почвы. К ним относятся сибирская язва, газовая гангрена (рис. 12.6) и др. Почва является источником попадания патогенных микробов в пищевые продукты.



a

б

Рис. 12.6. Почвенные инфекции: *a* – возбудитель сибирской язвы (*Bacillus anthracis*);
б – возбудитель газовой гангрены (*Clostridium perfringens*)

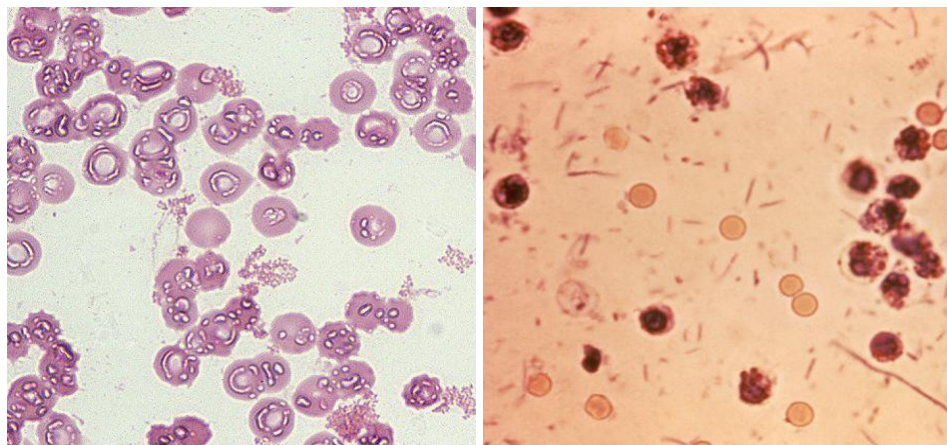
Загрязненная патогенными микробами вода также может быть источником заражения человека и животных, если ее использовать необезвреженной.

Инфекции, которые передаются через воздух, называются аэрогенными. Они могут быть как пылевые, так и капельные. При пылевой инфекции заражение происходит при вдыхании воздуха вместе с пылью, при этом наибольшую опасность представляют микробы, хорошо переносящие высыхание (споры патогенных микробов, туберкулезная палочка и гноеродные микроорганизмы). Капельной инфекцией можно заразиться, вдыхая воздух с мельчайшими капельками мокроты, носовой слизи или слюны, которые могут находиться в воздухе от 4 до 48 ч (грипп, ящур).

Также источником инфекции может служить навоз, зараженный патогенными микробами. Многие инфекции передаются через необезвреженное молоко больных животных, через кровососущих членистоногих, когда возбудитель инфекции находится в крови.

Патогенные микробы, передаваемые через молоко, делят на две основные группы.

К первой группе относятся заболевания, общие для человека и животных (бруцеллез (рис. 12.7, *a*), туберкулез, сибирская язва), ко второй – передаваемые от человека к человеку (брюшной тиф, паратифы, бактериальная дизентерия (рис. 12.7, *б*), холера).



a

б

Рис. 12.7. Патогенные микробы, передаваемые через молоко: *a* – возбудитель бруцеллеза (*Brucella abortus*); *б* – возбудитель бактериальной дизентерии (*Shigella*)

Заразные заболевания животных, которые передаются человеку, называются антропозо-

озоами. Они могут распространяться путем контакта с зараженной тушей, через инфицированное мясо, воду, почву, инфицированную тару и одежду. К ним относятся такие заболевания, как сибирская язва, туберкулез, бруцеллез, ящур, рожа свиней (рис. 12.8, а), листериоз, сальмонеллез, туляремия (рис. 12.8, б), лихорадка, лептоспироз и др.

Патогенные микроорганизмы сохраняются на продуктах питания длительное время, если их не обработать специальными средствами.

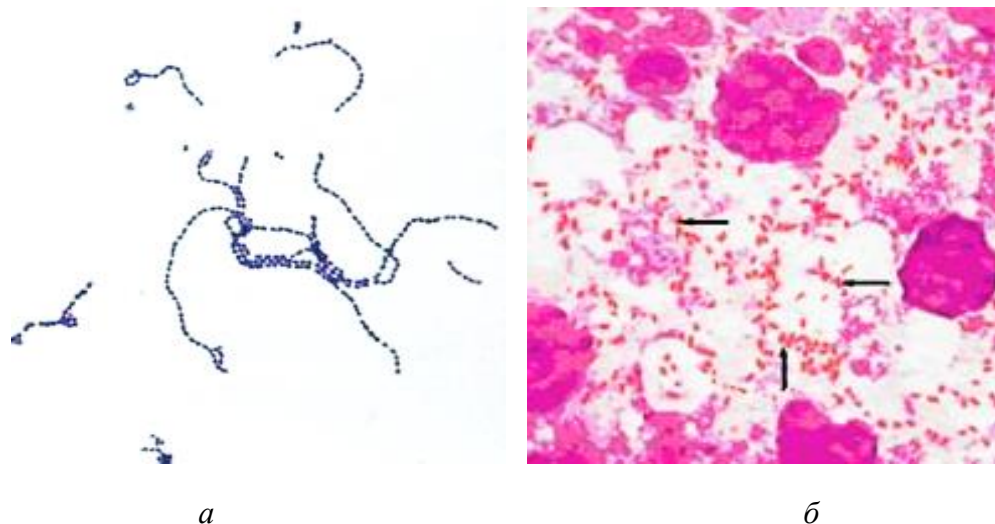


Рис. 12.8. Антропоозоозы животных: а – возбудитель рожи свиней (бак. *Erysipelothrix rhusiopathiae*); б – возбудитель туляремии (*Francisella tularensis*)

Задание 2. Освоить методику определения сахаролитических, протеолитических (методика определения аммиака, сероводорода, индола и др.) и окислительно-восстановительных свойств микроорганизмов.

Методика определения сахаролитических свойств.

Пробирки с набором сред Гисса ставят в штатив в один ряд. На каждой пробирке надписывают название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, указывают номер или вид исследуемой микробной культуры. Культуру берут на кончик петли в очень небольшом количестве и засевают по общепринятой методике. Затем пробирки помещают в термостат при температуре 25–30 °С (для патогенных – 37 °С). Определяют в каждой пробирке произошедшие изменения, указывают на наличие кислотообразования буквой «к», что видно по покраснению среды, и газообразования – буквой «г», в том случае, если поплавки заполнены газом.

Приготавливают препарат-мазок, окрашивают по Граму. Микроскопируют и определяют морфологию микроба. Зарисовывают микроскопическую картину.

Методика определения протеолитических свойств микробов.

Методика определения аммиака. Аммиак в среде с бактериальной культурой определяют с помощью реактива Несслера. Для этого в фарфоровую чашку пипеткой вносят каплю культуры, выращенной на мясопептонном бульоне, и каплю реактива Несслера.

При наличии аммиака смесь окрашивается в желтый или коричневый цвет. Коричневое окрашивание указывает на большое содержание продукта гнилостного распада.

Методика определения сероводорода. Над культурой исследуемых микробов помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (бумажка закрепляется между пробкой и стенкой пробирки). Пробирку помещают на 3 суток в термостат.

Почернение бумаги происходит при содержании сероводорода, который превращает уксуснокислый свинец в сернокислый.

Методика определения окислительно-восстановительных свойств микроорганизмов.

Производят посев исследуемой культуры микроорганизмов на среду молоко с метиленовым синим. Пробирки с посевами помещают в термостат на 3 суток. Микроорганизмы, образующие ферменты оксидазы и дегидразы, окисляют одни органические вещества в среде и восстанавливают другие. При этом молоко обесцвечивается и приобретает кремовый или белый цвет.

Контрольные вопросы

1. Что такое биохимические свойства микроорганизмов?
2. Характеристика биохимических особенностей бактерий.
3. Какие ферменты микроорганизмов вы знаете?
4. Как определяют сахаролитические свойства микроорганизмов?
5. Что такое протеолитические свойства микроорганизмов?
6. Выявление окислительно-восстановительных ферментов микроорганизмов.
7. Что такое аутолитические свойства микробов?
8. Какие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы передаются через молоко?
9. Определение продукции гидролитических ферментов.

Лабораторное занятие 13. ВОЗБУДИТЕЛИ БРОЖЕНИЯ И ПРОДУКТЫ ИХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Цель занятия: изучить возбудителей брожения и продукты их жизнедеятельности. Изучить механизмы реакции молочнокислого и спиртового брожений, ознакомиться с микроорганизмами, инициирующими брожение.

Материалы и оборудование: колбы с пробами спиртового, молочнокислого, маслянокислого, уксуснокислого и пектинового брожения; бактериологические петли, предметные стекла, покровные стекла, реактивы для окрашивания микроорганизмов по Граму, раствор йода, этиловый спирт, концентрированная серная кислота, эксикатор, мел, картофель; термостат, микроскоп.

Ход занятия

Задание 1. Изучить микроорганизмы, участвующие в спиртовом, молочнокислом, маслянокислом, уксуснокислом брожении и брожении пективновых веществ.

Спиртовое брожение представляет собой разложение сахара на этиловый спирт и углекислоту с выделением свободной энергии. Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе – дикие дрожжи. К ним относятся дрожжевые грибы рода *Mycoderma* и *Torula*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии.

Наиболее важное хозяйственное значение имеют дрожжевые грибы, принадлежащие к семейству *Saccharomycetaceae* роду *Saccharomyces* (рис. 13.1). Различные виды этих дрожжей применяются в кондитерской промышленности, при получении вина, приготовлении различных продуктов.

Спиртовое брожение идет в анаэробных условиях. Образующийся спирт вреден для дрожжей, и при его накоплении брожение прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15 % спирта.

Для культивирования дрожжей применяют питательные среды, богатые сахарами: солодовое сусло, виноградный сок, МПБ с 1 % глюкозы или синтетические среды, в состав ко-

торых входят углеводы. Дрожжи хорошо развиваются в кислой среде (рН 3,0–6,0) при температуре 25–30 °С.

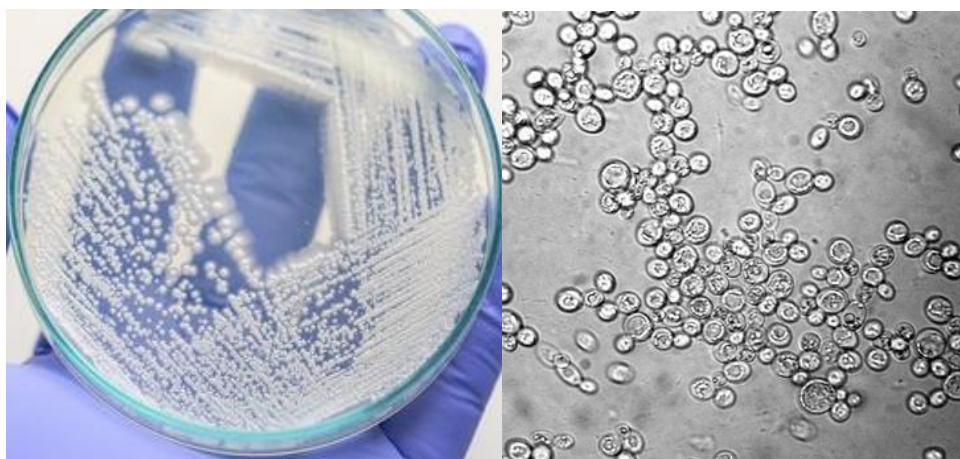


Рис. 13.1. Дрожжевые грибы рода *Saccharomyces*

Солодовое сусло. Сусло, полученное на пивоваренном заводе (рис. 13.2, а), стерилизуют и оставляют на 3–4 недели. Сусло фильтруют, разбавляют в соотношении 1:2 водопроводной водой, разливают в пробирки, стерилизуют при температуре 100 °С в течение 30 мин.



Рис. 13.2. Питательные среды для культивирования дрожжей:
а – солодовое сусло; б – дрожжевая вода

Дрожжевая вода. К 1 л водопроводной воды добавляют 80 г прессованных или 20 г сухих дрожжей и кипятят смесь в течение 15 мин. Затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам и стерилизуют при температуре 120 °С в течение 20 мин.

Для получения плотной среды к дрожжевой воде (рис. 13.2, б) добавляют 2 % агар-агара, готовят аналогично, как МПА.

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов.

По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, CO₂ и др.

К первой группе относятся: *молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки* (рис. 13.3).

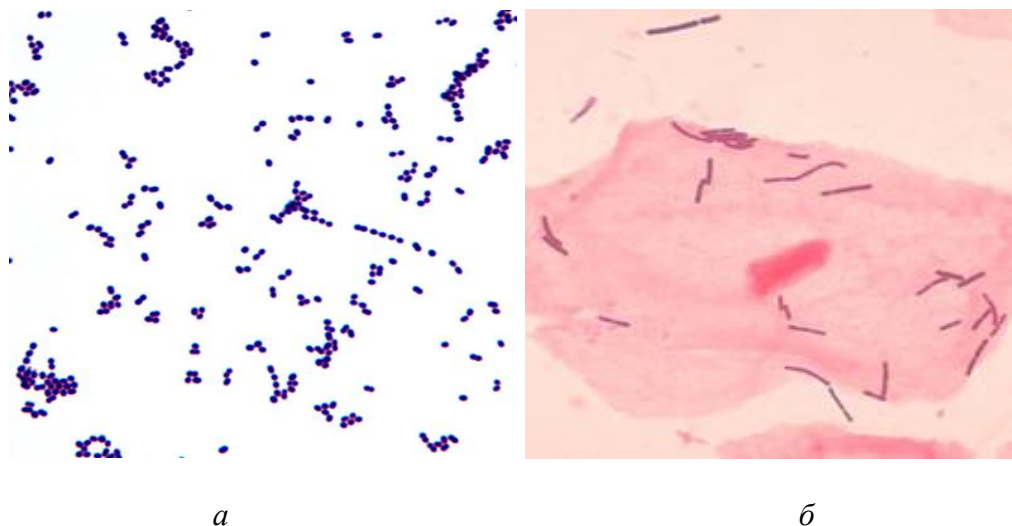


Рис. 13.3. Возбудители молочнокислого брожения: *а* – молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*); *б* – ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*)

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*) – факультативный анаэроб, неспорообразующий, неподвижный. Располагается короткими цепочками или попарно в виде двух слегка вытянутых диплококков. По Граму окрашивается положительно. Оптимальная температура роста составляет 30–37 °С.

Сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*) встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

Ацидофильная палочка (*Lactobacterium acidophilum*) по морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

Болгарская палочка (*Vac. bugaricum*) – крупная, бесспорная, неподвижная. Располагается парами или короткими цепочками. По Граму окрашивается положительно. Оптимальная температура роста – 40–45 °С.

Ко второй группе гетероферментативных бактерий относятся: *капустная палочка, ряд лактобацилл*, а также *кефирные дрожжи и молочная плесень*. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе.

Капустная палочка (*Lactobacterium brassicae*) вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, она грамположительна, сцеплена в пары и цепочки. Температурный оптимум развития – 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовые бактерии, попадающие в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

Кефирные дрожжи (*Saccharomyces kefir*) – это дрожжи, которые переводят молочный сахар (лактозу) в спирт, при этом вырабатывая небольшое количество спирта.

Молочную плесень (*Oidium lactis*) можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах. Она имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до CO₂ и воды, ухудшая качество скисшего молока.

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой облигатных анаэробных спороносных бактерий из рода *Clostridium*. Данные бактерии встречаются в загрязненной воде, верхних слоях почвы, навозе, молоке, сыре (рис. 13.4). К ним относятся *Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. pectinovorum* и др.

Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий. Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений.

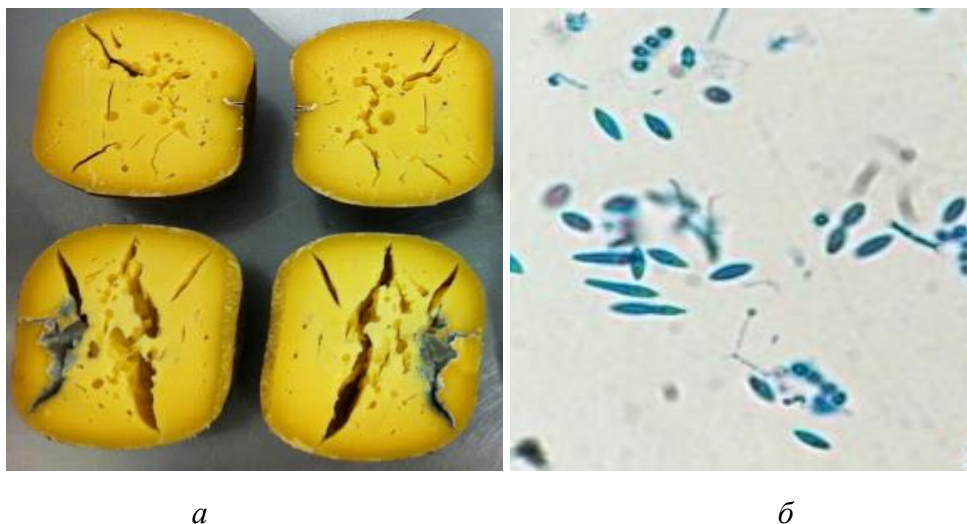


Рис. 13.4. Сыр, обсемененный клостридиями, которые участвуют в маслянокислом брожении

Процесс **уксуснокислого брожения** вызывается группой бактерий, являющихся облигатными аэробами. Они окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды в строго аэробных условиях.

При этом выделяется значительное количество энергии. Различные продукты, содержащие алкоголь (спирт, вино, пиво), являются благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих сюда из воздуха.

Изучено несколько видов уксуснокислых бактерий – *Bact. acetici*, *Bact. pasteurianum*, *Bact. xylinum* и др. Все они имеют форму палочек, грамтрицательны, спор и капсул не образуют, располагаются цепочками. Уксуснокислые бактерии являются строгими аэробами и всегда развиваются на поверхности сбраживаемой жидкости в виде серовато-белой гладкой или морщинистой пленки.

Один вид уксуснокислых бактерий отличается от другого по внешнему виду пленок и их отношению к окраске йодом. *Bact. pasteurianum* образует сухую морщинистую пленку. Если внести кусочек пленки в каплю йода, то пленка синее. *Bact. kützingianum* растет в виде слизистой гладкой пленки, поднимающейся по стенкам колбы, с йодом дает синее окрашивание. Пленка *Bact. acetici* гладкая и слизистая, по стенкам не поднимается, йодом окрашивается в желтый цвет.

Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологически близка к *Acetobacter acetii*. Развивается на алкогольных напитках.

Брожение пектиновых веществ вызывается анаэробным микроорганизмом *Granulobacter pectinovorum* – крупной, подвижной, спорообразующей палочкой. В результате брожения образуются масляная, уксусная кислоты, углекислота и водород. Аэробное брожение пектиновых веществ идет при участии сенной, картофельной палочек и разных видов мукоровых грибов.

Задание 2. Приготовить препараты-мазки возбудителей брожения (спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, уксуснокислое и пектиновое), окрасить по Граму. Провести микроскопирование культурных дрожжей родов *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*, молочной плесени (гнилостных бактерий, многоклеточного мицелия), молочнокислых бактерий, а также препаратов, в которых обнаруживаются *Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum*. Изучить микроорганизмы, участвующие в превращении спирта в уксусную кислоту. Зарисовать полученные результаты в тетради.

Для ознакомления с бактериями спиртового брожения необходимо в колбу объемом 250 мл налить 50 мл 20%-ного раствора сахарозы и добавить около 1 г дрожжей, разведенных в 10 мл раствора сахарозы (20 %). Затем колбу закрывают ватной пробкой и ставят в термостат при температуре около 35–40 °С на несколько дней. Полученные микроорганизмы окрашивают и микроскопируют.

Для приготовления препаратов-мазков с бактериями молочнокислого брожения (гомоферментативное брожение) можно воспользоваться готовыми молочнокислыми продуктами (простокваша, ацидофилин, кефир) и рассолом (гетероферментативное брожение). Указанные продукты наносят петлей на предметное стекло и делают тонкий мазок. Окрашивают в течение 3–5 мин водным раствором метиленового синего и микроскопируют.

Для культивирования маслянокислых бактерий в лабораторных условиях применяют картофельную среду.

В колбу помещают несколько ломтиков неочищенного картофеля, заполняют ими пробирку на 1/3 объема, добавляют 0,5–1 г мела и заполняют водопроводной водой до края. Колбу ставят на водяную баню при температуре 80 °С на 10–15 мин. Затем колбу со средой помещают в термостат при температуре 37 °С.

Через 2–3 суток в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения.

Для качественного определения уксусной кислоты необходимо к 5 мл исследуемой жидкости добавить 0,5 мл этилового спирта и 2–3 мл концентрированной серной кислоты. Смесь подогревают. Запах грушевой эссенции (уксусноэтилового эфира) указывает на присутствие уксусной кислоты.

Для получения чистой культуры *Granulobacter pectinovorum* берут простерилизованные ломтики картофеля, обсыпают мелом и наносят на них каплю жидкости из сброженной соломки. Бактериологическую чашку с картофелем помещают в эксикатор, выкачивают воздух и ставят в термостат при температуре 35 °С. На поверхности картофеля вырастают колонии бацилл пектинового брожения.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимы для протекания брожения?
2. Назовите ферменты процессов брожения.
3. Чем отличается гомоферментативный процесс от гетероферментативного?
4. Молочнокислое брожение: возбудители, химизм, применение в животноводстве и промышленности.
5. В чем заключается суть уксуснокислого брожения?
6. Маслянокислое брожение: химизм, возбудители и использование.
7. Пектиновое брожение: химизм, возбудители и использование.
8. Что такое солодовое сусло? Для чего оно используется?
9. Как определяется вид возбудителей брожения?
10. Как приготовить препараты-мазки возбудителей брожения?
11. Какое используется оборудование и материалы для исследования возбудителей брожения?
12. Назовите культурные расы дрожжей, вызывающих спиртовое брожение.
13. Каким способом можно обнаружить молочную кислоту?
14. Как можно получить культуру маслянокислых бактерий?
15. Каковы особенности бактерий рода *Clostridium*?

Лабораторное занятие 14. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Цель занятия: ознакомиться с правилами взятия материала и пересылкой его для лабораторного исследования, с методами лабораторной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

Материалы и оборудование: микроскопы, иммерсионное масло; окрашенные мазки сибирской язвы, мазки с рожистой палочкой, мазки с туберкулезной палочкой, культура кишечной палочки на среде Эндо; предметные стекла, набор реактивов для окрашивания по Граму, горелки, бактериологические петли; демонстрационные таблицы.

Ход занятия

Задание 1. Ознакомиться с правилами отбора материала для лабораторных исследований.

Бактериальная или вирусная инфекция – это сложный биологический процесс взаимодействия макроорганизма и возбудителя болезни, происходящий при определенных условиях внешней среды.

В процессе эволюции одни виды микроорганизмов приспособились к паразитированию только в организме млекопитающих, другие – только в организме человека или рыб.

Действие патогенных микробов на организм высокоспецифичное, т. е. каждый вид их вызывает определенный инфекционный процесс. Степень патогенности (вирулентность) у разных штаммов одного и того же вида может быть различной.

При диагностике вирусной инфекции устанавливают диагноз, выясняют пути заноса инфекции, определяют факторы, способствующие распространению инфекции среди животных.

Правила отбора материала и пересылка его для лабораторного исследования. Исследуемый материал необходимо отбирать стерильными инструментами в стерильную посуду. Поверхность органа (ткани) на месте разреза следует прижечь шпателем или металлической пластинкой.

Материал берут не позднее 2 ч после гибели животного, особенно в теплое время года.

Материал отправляют в лабораторию в неконсервированном виде в случае его доставки в течение 24 ч. Если это невозможно, материал посылают в замороженном (в термосе со льдом) или консервированном виде. Для консервирования используют 30%-ный водный раствор химически чистого глицерина или стерильное вазелиновое масло. Материал заливают консервирующей жидкостью в соотношении 1:5.

Трупы мелких животных (поросят, ягнят, птиц) посылают целиком в непроницаемой таре.

Фекальные массы для исследования отправляют в стерильных стаканах, банках, пробирках, плотно закрытых пергаментной бумагой. От трупов животных фекалии можно посылать в отрезке не вскрытого кишечника, перевязанного с обоих концов. Фекалии необходимо доставить в лабораторию не позднее 24 ч после их взятия.

Кожу для исследования берут из наиболее пораженных мест (размером 10×10 см) и посылают в стерильной герметически закупоренной посуде.

Кровь, гной, слизь, экссудат, мочу, желчь и другой материал посылают в лабораторию в запаянных пастеровских пипетках или стерильных пробирках, флаконах, хорошо закрытых стерильными резиновыми пробками.

Небольшое количество крови у животных можно получить из мелких кровеносных сосудов уха (рис. 14.1), у пушных зверей – из лапки (пальца), кончика хвоста, у кур – из гребня или сережек, у уток и гусей – из мякоти ступни конечностей, у мышей – из хвоста.



Рис. 14.1. Отбор проб крови у сельскохозяйственных животных

Для получения большого количества крови ее берут у крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, верблюдов, буйволов, яков, оленей из яремной вены; у свиней – из орбитального венозного синуса или из хвоста; у собак – из вены сафена или подкожной вены предплечья; у песцов и лисиц – из плантарной вены; у кроликов – из ушной вены; у морских свинок – из сердца; у птиц – из подкрыльцовой вены; у белых мышей и крыс – из подмышечного «кармана» или путем декапитации.

Взятие крови производят с соблюдением правил асептики и антисептики.

Кровь желательно брать утром, до кормления животных. Взятую кровь выдерживают около часа при температуре 20–30 °С для свертывания, затем кровь отделяют от стенок пробирки металлической спицей или стеклянной палочкой. Далее кровь помещают в прохладное помещение и отстаивают в течение 10–12 ч для получения сыворотки, которую переносят в другие пробирки. Сыворотку доставляют в лабораторию не позже одних суток. При пересылке на большие расстояния в теплое время года сыворотку консервируют 5%-ным раствором карболовой кислоты из расчета 1–2 капли на 1 мл сыворотки или же борной кислотой из расчета 0,05–0,07 г на одну пробирку. Высылают в лабораторию не менее 2–3 мл сыворотки. На каждой пробе сыворотки указывают вид животного, его инвентарный номер. Пробы направляют с описью в двух экземплярах. Пересылают пробирки с плотно закрытыми резиновыми пробками в вертикальном положении.

Мазки крови делают тонкими, равномерными, достаточной длины. На них делают надпись с указанием номера или клички животного и даты изготовления.

Материал посылают для исследования в лабораторию с нарочным. Материал необходимо завернуть в холст или мешковину, пропитанную дезраствором, и уложить в плотный деревянный или металлический ящик со стружками, мякиной или опилками. Ящик с материалом для лабораторных исследований, подозрительным на наличие возбудителей особо опасных болезней, пломбируют или опечатывают. При этом оформляют сопроводительный документ, который посылают с нарочным в запечатанном конверте одновременно с материалом. В сопроводительном документе указывают адрес хозяйства, вид исследования, на которое направляется материал, подробно описывают направляемый материал, указывают его количество и количество упаковок с ним, вид, пол, масть и возраст животного, его инвентарный номер или кличку, приводят краткое описание эпизоотической ситуации, дату заболевания, дату вынужденного убоя или падежа, краткое описание клинических признаков и патологоанатомических изменений. В заключении в сопроводительном документе ставится предположительный диагноз, дата, должность и подпись специалиста, отправившего материал.

Патологический материал принимает в лаборатории ответственный работник, который проверяет правильность упаковки и соответствие материала сопроводительному документу. В случае если установлены несоответствия отправленного материала записям в сопроводительном документе или его порча, составляется акт, копию которого направляют

ветеринарному врачу, отобравшему материал для исследования.

Задание 2. Изучить методы лабораторной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

Для диагностики бактериальных инфекций применяют следующие лабораторные методы:

1. Бактериологическая микроскопия. Из патологического материала готовят мазки. Окрашивают и рассматривают под микроскопом.

2. Бактериологический метод – посев на питательные среды для определения культуральных и биохимических свойств и выделения чистой культуры.

3. Выделение токсинов. Некоторые микроорганизмы способны продуцировать ядовитые вещества – токсины. Различают экзотоксины и эндотоксины.

4. Серологический метод. Заключается в проведении реакций, посредством которых в сыворотке крови больных животных выявляют специфические антитела, а в патологическом материале – антигены (РА, РП, РСК и др.).

5. Биологический метод. Сводится к искусственному заражению животных для воспроизведения экспериментальной инфекции и подтверждения предполагаемого диагноза.

Экспериментальное заражение лабораторных животных проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя болезни, испытания патогенности изучаемого микроорганизма, определения эффективности вакцин, иммунных сывороток.

Для диагностики вирусных инфекций применяют следующие лабораторные методы:

1. Заражение куриных эмбрионов.

2. Исследование того патологического материала, в котором вирус оставляет свои следы. Например, бешенство – возбудителем является нейротропный вирус. В лабораторию посылают голову животного, проводят микроскопию мозга на наличие телец Бабеша – Негри. Инфекционный гепатит – возбудителем является вирус из семейства аденовирусов. Проводят исследование печеночных клеток на наличие включений типа Рубарта.

3. Серологический метод.

4. Биологический метод (биопроба).

Задание 3. Микроскопировать готовые препараты-мазки возбудителей инфекционных болезней. Микроскопическую картину зарисовать в тетради.

По таблицам, рисункам познакомиться и изучить основные свойства возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. По мазкам изучить морфологию, особенности строения каждого микроорганизма – возбудителя инфекционной болезни. Зарисовать и сделать необходимые записи в тетради.

Контрольные вопросы

1. Что такое инфекция, инфекционный процесс?
2. Перечислите лабораторные методы диагностики бактериальных инфекций.
3. Перечислите лабораторные методы диагностики вирусных инфекций.
4. Как проводят исследования патологического материала?
5. Как диагностируют бактериальную или вирусную инфекцию?
6. Правила взятия крови для лабораторных исследований.
7. Опишите приготовление мазков для лабораторных исследований.
8. Как проводится передача патологических материалов в научно-исследовательскую лабораторию?
9. Оформление сопроводительных документов, актов на патологический материал в лабораторию.