

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

**Методические указания по выполнению лабораторных работ по
дисциплинам «Микробиология с основами вирусологии» и
«Микробиология»**

Часть 1

Тула
Издательство ТулГУ
2016

УДК 581

Составили: М. А. Чепурнова, Е. В. Акатова, И. А. Нечаева

Методические указания по выполнению лабораторных работ по дисциплинам «Микробиология с основами вирусологии» и «Микробиология». Часть 1. Тула : Изд-во ТулГУ, 2016. – 120 с.

ISBN 978-5-7679-3358-7

ISBN 978-5-7679-3356-3 (Ч.1)

Приведены 25 лабораторных работ, выполнение которых будет способствовать усвоению студентами теоретического материала по курсам «Микробиология с основами вирусологии» и «Микробиология» очной, очно-заочной и заочной форм обучения. Направления подготовки 06.03.01 Биология, 19.03.01 Биотехнология.

Печатается по решению библиотечно-издательского совета
Тулльского государственного университета.

ISBN 978-5-7679-3358-7
ISBN 978-5-7679-3356-3 (Ч.1)

© М. А. Чепурнова,
Е. В. Акатова
И. А. Нечаева, 2016.
© Издательство ТулГУ, 2016

Оглавление

РАЗДЕЛ 1: ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	5
Лабораторная работа №1	5
Устройство микробиологической лаборатории.....	5
Правила работы в ней.	5
Лабораторная работа № 2	11
Методы стерилизации	11
Лабораторная работа № 3	21
Микроскоп и техника микроскопирования. Устройство микроскопа. Виды микроскопии.....	21
Лабораторная работа № 4	32
Морфология бактерий, цианобактерий, дрожжей и мицелиальных грибов	32
Лабораторная работа № 5	43
Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов. Простые и дифференцированные методы окрашивания. Окрашка бактерий по Граму	43
Лабораторная работа № 6	51
Исследование микроорганизмов в живом состоянии.....	51
Лабораторная работа № 7	54
Споры бактерий.....	54
РАЗДЕЛ 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД	59
Лабораторная работа № 8	59
Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Приготовление питательных сред различного состава	59
Лабораторная работа № 9	66

Значение отдельных элементов питания в развитии микроорганизмов	66
РАЗДЕЛ 4: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ	70
Лабораторная работа № 10.....	70
Культивирование анаэробных микроорганизмов	70
Лабораторная работа № 11.....	74
Выделение чистой культуры бактерий	74
Лабораторная работа № 12.....	81
Фазы роста микробиологических культур и расчет кинетических параметров роста.....	81
РАЗДЕЛ 5: МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ	108
Лабораторная работа № 13.....	108
Методы количественного учета микроорганизмов. Определение количества клеток микроорганизмов высевом на плотные питательные среды (метод Коха).....	108
Лабораторная работа № 14.....	113
Методы количественного учета микроорганизмов.Определение количества клеток микроорганизмов под микроскопом	113
Литература	118

РАЗДЕЛ 1: ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Лабораторная работа №1

Устройство микробиологической лаборатории.

Правила работы в ней

Цель работы: познакомиться с устройством микробиологической лаборатории, основным оборудованием, правилами работы.

Основные положения

Биологические процессы имеют свою специфику. Они осуществляются с использованием различных биологических систем, включая как живые организмы (микроорганизмы), так и их компоненты (ферменты, их комплексы и др.). При этом микробиологи используют, как правило, *чистые культуры микроорганизмов* (т.е. культуры, содержащие микроорганизмы одного вида), а принцип асептики любого микробиологического процесса является одним из основных. В связи с чем, требование чистоты используемых культур и соблюдение условий стерильности в работе в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.

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 должна включать ряд помещений. Основная лабораторная комната должна быть просторной и светлой. Естественное освещение должно составлять не менее 110 лк. Пол и поверхность всех рабочих столов покрывают легко моющимся материалом. Стены на высоту не менее 170 см окрашивают в светлые тона или облицовывают плиткой. Такая отделка позволяет проводить влажную уборку с применением растворов дезинфицирующих веществ. Лабораторные столы должны иметь подводку электроэнергии быть снабжены газовыми горелками. Помещение должно быть оборудовано шкафами и полками для хранения аппаратуры, посуды и реактивов. Кроме основного рабочего помещения лаборатория должна иметь стерилизационную, термостатированную комнату, холодильную комнату, моечную и др. В стерилизационной размещают автоклавы и сушильные шкафы. В термостатированной комнате выращивают микроорганизмы. В некоторых лабораториях из-за недостатка площадей используют термостаты различного типа для культивирования микроорганизмов при постоянной температуре. Вместо холодной комнаты используют холодильник и морозильную камеру.

Работу с микроорганизмами и культурами клеток осуществляют в боксах различных конструкций от изолированных помещений до настольных камер (ламинаров). Бокс – специальное изолированное помещение, разделенное на две части: рабочее помещение и предбоксник, что исключает резкую циркуляцию воздуха и занесение микроорганизмов извне. В боксе устанавливают стол, стулья, на стены подвешивают бактерицидные лампы на высоте 2 м от пола. Перед работой помещение бокса моют и дезинфицируют, а после

влажной уборки в течение 30-60 мин проводят стерилизацию воздуха бактерицидными лампами.

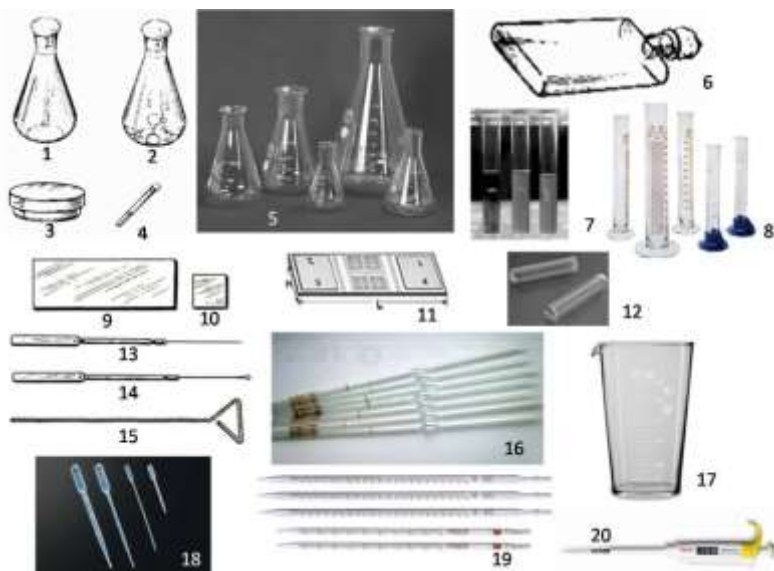


Рисунок 1. Инструменты и посуда, используемые в микробиологической лаборатории:

1 - качалочная колба, 2 - качалочная колба с отбойниками, 3 - чашка Петри, 4 - пробирка биологическая, 5 - колбы плоскодонные конические Эйлермейера, 6 – матрац, 7 – пробирки с поплавками, 8 – мерные цилиндры, 9 – предметное стекло, 10 – покровное стекло, 11 – камера Гаряева, 12 – поплавки (пробирки Уленгута), 13 – микробиологическая игла, 14 – микробиологическая петля, 15 – шпатель Дригальского, 16 – пипетки Мора, 17 – мензурка, 18 – пипетки Пастера, 19 – пипетки градуированные, 20 – пипетка автоматическая.

Посуда и инвентарь для проведения микробиологических исследований. Для микробиологических исследований необходима различная стеклянная посуда (рис. 1). *Чашки Петри* (диаметр 10 см, высота 1,5 см) применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, анализа качественного состава микрофлоры на плотных питательных средах и других исследований; *стеклянные поплавки* - для изучения процессов брожения; *пробирки биологические* – для хранения чистых культур и проведения микробиологических исследований; *пастеровские пипетки* с оттянутым капилляром. Кроме специальной посуды широко используют обычную химическую посуду: *колбы плоскодонные конические Эйлера*, *круглодонные*, *мерные*, *градуированные пипетки*, *пипетки Мора*, *мензурки*, *мерные цилиндры*, *бюксы*, *склянки* и т.д. Колбы и пробирки, используемые для приготовления и стерилизации питательных сред и выращивания микроорганизмов, закрывают ватно-марлевыми пробками, которые изготовляют вручную или при помощи специальной машины. Правильно изготовленная пробка для пробирок должна иметь длину 3-4 см, умеренно туго входить в пробирку, быть плотной и не менять своей формы при многократном применении.

В микробиологической практике применяют *петли*, *иглы*, *пинцеты*, *ножницы*, *пластмассовые и металлические штативы* для *пробирок*, *металлические лотки* и др. Петли и иглы изготовляют из платиновой, никелевой или хромоникелевой проволоки и закрепляют в металлическом петледержателе.

При работе в лаборатории микробиологии студент должен соблюдать следующие правила:

1. При работе в лаборатории с бактериологическим материалом необходимо тщательно соблюдать правила личной и общественной безопасности при ее выполнении.

2. Каждый студент должен работать на постоянном месте.

3. Рабочее место должно быть свободно от лишних предметов (сумок, портфелей).

4. Во время работы с горелкой или спиртовкой рядом не должно находиться легко воспламеняющихся материалов.

5. Работа выполняется в чистом халате. Длинные волосы должны быть собраны во избежание попадания в пламя горелки (спиртовки).

6. На каждом занятии назначаются дежурные, которые следят за порядком и за выполнением каждым студентом правил работы и поведения в лаборатории;

7. Посуда, в которой производится посев и культивирование микроорганизмов, должна быть подписана (дата посева, культура, группа или студент, производивший посев).

8. Предметы, которые использовались для работы с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки, либо выдерживанием в дезинфицирующем растворе (пипетки, шпатели, микробиологические иглы и петли, покрывные и предметные стекла).

9. Все засеянные чашки Петри, пробирки помещаются в термостат или сдаются лаборанту.

10. Обработанный материал помещается в автоклав для обеззараживания.

11. В лаборатории строго запрещается прием пищи.
12. По окончании занятия студент должен:
 - а) привести в порядок рабочее место;
 - б) сдать дежурному весь материал и микроскоп;
 - в) вымыть руки с мылом, при необходимости с дезинфицирующим раствором.

Задание.

1. Познакомиться с правилами работы в микробиологической лаборатории, отметить в журнале инструктажа по технике безопасности в лаборатории.

2. Познакомиться с устройством микробиологической лаборатории, выделить основные зоны: рабочую, стерилизационную, термостатированную, холодную, моечную.

3. Познакомиться с основным оборудованием лаборатории, сделать описание в лабораторной тетради.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается основной принцип любого микробиологического процесса?
2. Что определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога?
3. Какие помещения должна включать микробиологическая лаборатория?
4. Какие требования предъявляют к основной лаборатории?
5. Что размещают и для чего предназначены холодная, термостатированная и стерилизационная комнаты?
6. Что такое бокс?
7. Какой специфической посудой пользуются микробиологи?

8. Перечислите основные правила работы в лаборатории микробиологии.

Лабораторная работа № 2

Методы стерилизации

Цель работы: изучить основные методы стерилизации питательных сред, стеклянной посуды, инструментов и приборов.

Материалы и оборудование: стерилизатор паровой, сухожаровой шкаф. Колбы, пробирки, микробиологические петли, вата, марля, спирт.

Основные положения

Стерилизация (от лат. *sterilis* – обеспложивание) – методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развитие посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Если стерильная среда или микробная культура загрязняется случайно попавшими в нее микроорганизмами, то говорят о **контаминации**, или загрязнении.

Способы стерилизации зависят от особенностей материала, подлежащего стерилизации и цели исследования. Выделяют следующие способы стерилизации сред, посуды и инструментов:

1. Термическая стерилизация

1.1. Стерилизация в пламени горелки

Мелкие металлические инструменты: петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели – стерилизуют прокаливанием в пламени

(нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при пересевах культур и разливах сред. В пламени погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Петли делают из нихромовой или платиновой проволоки, чтобы при прокаливании на них не появлялась окалина. Если петля сухая, то ее в вертикальном положении вносят в верхнюю, самую горячую часть пламени и прокалывают до красного каления сначала ее нижнюю, а затем верхнюю часть. Если на петле находится какой-нибудь материал, то петлю в горизонтальном положении вносят в нижнюю, самую холодную часть пламени (если внести в горячую часть, то может произойти разбрызгивание материала), и только после того, как материал полностью сгорит, продолжают прокалывание в верхней – горячей части пламени.

1.2. Стерилизация сухим жаром

Обработка сухим горячим воздухом проводится в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации. Стерилизуют стеклянную посуду: чашки Петри, колбы, пробирки, пипетки и т.д., которые предварительно заворачивают в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Посуду разворачивают непосредственно перед употреблением. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Температурные режимы стерилизации сухим жаром представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

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

При нагреве выше 180 °С бумага и пробки начинают обугливаться. Посуду вынимают, предварительно охладив ее до 50-70 °С, поскольку нагретое стекло может растрескаться.

1.3. Стерилизация автоклавированием

Это наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации питательных сред. Основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивают эффективность этого процесса. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121 °С и лишь споры некоторых почвенных бактерий погибают при этой температуре только через 30 мин. Температурные режимы автоклавирования представлены в таблице 2.

Стерилизацию осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах – **автоклавах**.

Таблица 2. Температура насыщенного пара при разных давлениях

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

Автоклав представляет собой металлический двустенный котел (рис. 2), способный выдерживать высокое давление. Внутренняя часть котла – стерилизационная камера, в которую помещают стерилизуемый материал (питательные среды, посуда, рабочая одежда и т.д.). Она окружена водопаровой камерой, которая имеет кран для выхода воздуха и пара. Пар в стерилизационную камеру подается через специальные отверстия в водопаровой камере. Давление регулируется с помощью манометра. Внутрь стерилизационной камеры помещают стерилизуемые предметы (не слишком плотно). В водопаровую камеру через специальную воронку наливают дистиллированную воду до необходимого уровня. Крышку закрывают герметически при помощи специальных винтов.

Среды, содержащие сахара, витамины, дрожжевой автолизат и среды с желатином стерилизуют при давлении 1,5 атм в течение 15-30 мин. Среды, содержащие агар, стерилизуются труднее, поэтому их стерилизуют при 2,0 атм 20 мин.

1.4. Пастеризация

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C. Метод был предложен Л. Пастером и предназначен для уничтожения только бесспорных форм микроорганизмов. Проводится нагреванием до 50-60 °С в течение 15-30 мин. или до 70-80 °С в течение 5-10 мин с последующим охлаждением до 10-11 °С. Далее продукты хранят в холодильнике, т.к. споры при таком способе стерилизации выживают. Метод используют в пищевой промышленности для обработки молока, фруктовых соков, вина, пива и др.

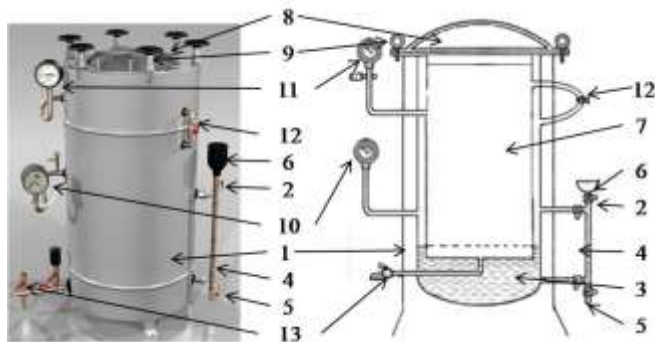


Рисунок 2. Стерилизатор паровой ВК-75-01. Схема автоклава: 1 - кожух, 2 - вентиль для заполнения автоклава водой, 3 - камера водопаровая, 4 - колонка водоуказательная для заполнения автоклава водой, 5 - вентиль для слива воды из автоклава, 6 - воронка для заполнения автоклава водой, 7 - камера стерилизационная, 8 - крышка, 9 - прижим, 10 - манометр электроконтактный измеряет давление в водопаровой камере, 11 - манометр измеряет давление в стерилизационной камере, 12 - вентиль для поступления пара в стерилизационную камеру, 13 - вентиль для удаления пара из стерилизационной камеры.

1.5. Тиндализация (дробная стерилизация)

Дробная стерилизация была предложена Джоном Тиндалем. Применяется для сред, не выдерживающих температуру выше 100 °С. Ее осуществляют текучим паром в автоклаве с незавинченной крышкой при открытом кране для выпуска пара или в специальном аппарате. Стерилизация проводится дробно: по 20-30 мин. в течение нескольких дней для уничтожения вегетативных клеток, проросших из спор. В промежутках между стерилизацией среды ставят в термостат при температуре 30 °С на 8-12 ч для прорастания жизнеспособных спор.

1.6. Кипячение

Некоторые предметы (металлические инструменты, мелкие стеклянные детали, мембранные фильтры) можно стерилизовать длительным (20-30 мин.) кипячением в дистиллированной воде. Для этого используют специальные закрытые сосуды – стерилизаторы. Надежность стерилизации при кипячении можно увеличить внесением в воду бактерицидного средства (2% формальдегида и др.).

2. Холодная стерилизация

2.1. Стерилизация фильтрованием

Стерилизуют синтетические среды строго определенного состава, которые содержат легкоразрушающиеся или летучие компоненты – витамины, аминокислоты, белки, ароматические углеводороды, антибиотики и др. Фильтрацию жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и т.д.

Широко используются мембранные фильтры – диски разного размера, диаметра, напоминающие бумажные. Их изготавливают на основе нитроцеллюлозы. Средний диаметр пор фильтров составляет 0,35-1,2 мкм. Для стерилизации, как правило, используют фильтр с диаметром пор 0,35 -0,45 мкм. Фильтры Зейтца – плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой (средний диаметр пор 0,8 – 1,8 мкм).

Мембранные фильтры стерилизуют автоклавированием при 2 атм 15 мин.

2.2. Стерилизация газообразными веществами

Стерилизуют аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое оборудование, изделия из термолабильных пластмасс. Для этого применяют соединения, которые обладают спороцидными свойствами – оксид этилена, метилбромид, формальдегид, озон и др.

Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. При стерилизации строго контролируют концентрацию газа, давление, влажность, температуру и длительность экспозиции. Часто процесс проводят в сочетании с некоторым повышением температуры (до 45-70 °С). По окончании стерилизации удаляют газы из аппарата, а использование предметов, простерилизованных газами, можно не ранее чем через 24 ч (необходимо для полного удаления из них газов).

2.3. Стерилизация облучением

Для стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов используют разные виды излучений: инфракрасное, УФ, рентгеновские лучи, α -, β -

, γ -лучи радиоактивных элементов. Чаще других в микробиологической практике используют УФ облучение.

В настоящее время все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

2.4. Химический метод стерилизации

Уничтожение (дезинфекция) микроорганизмов с помощью сильнодействующих химических веществ (антисептиков). Антисептики могут быть неорганической и органической природы. К первой группе относятся кислоты, щелочи и соли (0,1-0,2 % раствор сулемы), хлорная известь, йод. Ко второй группе - этиловый и бутиловый спирт, альдегиды, органические растворители (0,5-3 % раствор хлорамина, 1-4 % раствор формалина) и органические кислоты. Этот метод чаще всего применяется для дезинфекции рабочих поверхностей, рук, боксов.

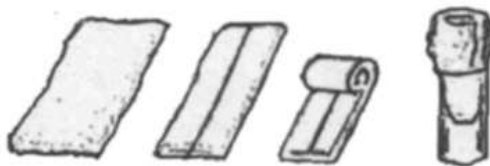
3. *Приготовление ватных пробок*

Их готовят из гигроскопической ваты, поскольку она хорошо обеспечивает стерильность субстрата и не сильно тлеет. Для изготовления пробки (рис. 3) берут прямоугольный кусочек ваты, загибают его края и сворачивают плотным валиком, примеривая его к горлышку пробирки или колбы. Проверить качество пробок: хлопок в момент открывания пробирки, очень твердая ("каменная") на ощупь.

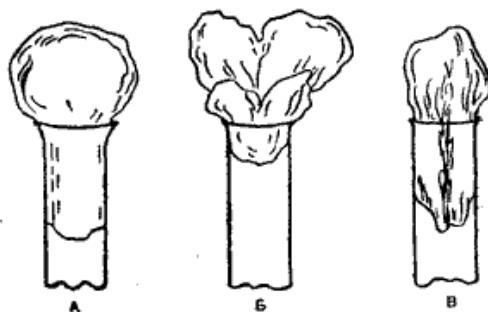
Валик плотно оборачивают марлей так, чтобы вся вата была под ней, и завязывают нитками. Лишние концы марли обрезают. Пробка для пробирок должна иметь длину не более 3 см, быть достаточно плотной, хорошо сохранять свою форму и свободно

входить в нее. Поверх пробки на колбу надевают бумажные колпачки, которые предохраняют ее горлышко от пыли.

Не использовать пробки, изготовленные только из ваты - они легко воспламеняются при обжигании!



(1)



(2)

Рисунок 3. Изготовление ватных пробок (1). Вид пробок (2): А – правильно изготовленная пробка, Б и В – не правильно изготовленная пробка

Задание:

1. Познакомиться с основными методами стерилизации.
2. Провести стерилизацию стеклянной посуды (чашки Петри, пипетки, колбы, пробирки) сухим жаром. Для этого предварительно оберните в бумагу посуду и поместите в сушильный шкаф. Режим стерилизации: 170 °С, время – 60 мин.

3. Подготовить к стерилизации 3–5 пробирок и 1–2 колбы. Для этого чистые пробирки и колбы закрывают ватными пробками, которые необходимо приготовить.
4. Провести дезинфекцию рабочих поверхностей и ламинарного бокса химическим методом, используя этиловый спирт, либо раствор хлорамина.
5. Освойте метод стерилизации в пламени горелки, используя металлические и стеклянные инструменты (микробиологические петли, пинцеты, ножницы, шпатель).
6. Нарисуйте схему устройства автоклава, отметьте его основные части.

Контрольные вопросы.

1. Какой процесс называется дезинфекцией?
2. Какие вещества используются для проведения дезинфекции?
3. Какой процесс называется стерилизацией?
4. Какими способами можно проводить стерилизацию?
5. Что и при каких условиях стерилизуют в автоклаве, в сушильном шкафу и кипячением?
6. Чем отличается тиндализация от пастеризации?
7. Какие химические вещества используют для холодной стерилизации?

РАЗДЕЛ 2: МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 3

Микроскоп и техника микроскопирования. Устройство микроскопа.

Виды микроскопии

Цель работы: изучить устройство светового биологического микроскопа и освоить правила работы с ним. Ознакомиться с различными видами микроскопии.

Материалы и оборудование: микроскоп; иммерсионное масло; препараты микроорганизмов.

Основные положения

1. Устройство микроскопа

Микроскоп (от греч. *micros* – малый и *scopio* – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной. Схема светового биологического микроскопа представлена на рис. 4.

Механическая часть или штатив состоит из ножки, основания, тубусодержателя, предметного столика, бинокулярной насадки (тубуса), revolverного устройства, рукоятки грубой фокусировки (макрометрического винта), рукоятки тонкой фокусировки (микрометрического винта).

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси revolverное устройство

(револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус.

Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.



Рисунок 4.Схема устройства светового биологического микроскопа
(Биомед 4).

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно.

Оптическая часть является наиболее ценной частью микроскопа. Она состоит из объективов и окуляра.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света. Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра (x7; x10; x15).

Объективы ввинчиваются в гнезда револьверного устройства и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения (явления

сферической и хроматической аберрации) и называются коррекционными.

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

При работе с *сухими объективами* (x8, x20, x40) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае лучи света проходят среды с различными показателями преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с *иммерсионными объективами* (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют окуляр x15, а под тубусом находится объектив x90, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит x1350.

Осветительная часть микроскопа состоит из двухлинзового конденсора, ирис-диафрагмы и патрона с низковольтной лампочкой накаливания, питающейся через понижающий трансформатор от сети напряжения 120 - 220 В.

Конденсор служит для лучшего освещения препарата. Он собирает световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. С помощью рукоятки для перемещения кронштейна конденсора его можно перемещать вверх и вниз, благодаря чему меняется угол сходимости лучей и, следовательно, степень освещения объекта. Чем выше положение конденсора, тем лучше освещен препарат.

Ирис-диафрагма располагается под конденсором и служит для регулировки потока света, поступающего в конденсор. Она состоит из металлических серповидных пластинок. Расширить или сузить отверстие диафрагмы можно с помощью специального рычажка. При вращении его по часовой стрелке отверстие ирис-диафрагмы увеличивается и, следовательно, увеличивается степень освещения объекта.

При работе с иммерсионными объективами степень освещения препарата должна быть максимальной, поэтому шторку ирис-диафрагмы открывают, а конденсор поднимают в крайнее верхнее положение.

При работе с сухими объективами, как правило, рассматривают неокрашенные объекты. Для достижения контрастности конденсор опускают вниз, а отверстие ирис-диафрагмы уменьшают.

2. *Правила работы с микроскопом*

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3 - 5 см от края стола;
2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение;

3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами;

4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно поднимают столик макровинтом до соприкосновения объектива с каплей масла. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно опускают столик, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект.

5. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива $\times 90$.

3. *Виды микроскопии*

Основными характеристиками микроскопа являются *общее увеличение и разрешающая способность*.

Общее увеличение не характеризует качества изображения, которое может быть четким и нечетким.

Четкость получаемого изображения определяется *разрешающей способностью* микроскопа, т.е. той наименьшей величиной объектов или их деталей, которые можно увидеть с помощью этого прибора. Разрешающая способность зависит от длины проходящего через объект света, показателя преломления оптической среды (показатель преломления воздуха равен 1,0; иммерсионного масла – 1,516; стекла – 1,520) и апертурного угла объектива:

$$d = \frac{\lambda}{2 \times n \times \sin \alpha}$$

где: d – минимальное расстояние между двумя точками, видимыми раздельно;

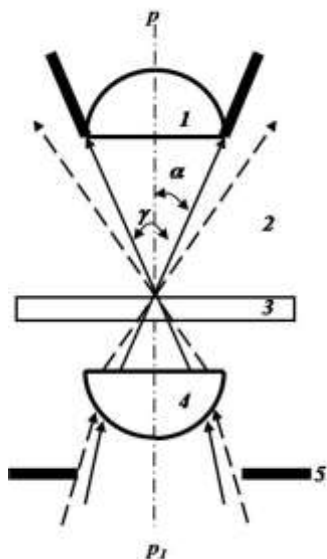
λ – длина волны света, проходящего через исследуемый объект;

$n \times \sin \alpha$ – числовая апертура;

n – показатель преломления светом оптической среды;

α – апертурный угол объектива.

На рис. 5 представлена схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла микроскопа (стрелками обозначен ход световых лучей).



- γ - отверстиеный угол;
- α - апертурный угол;
- 1 - фронтальная линза объектива;
- 2 - пространство между объектом и объективом;
- 3 - предметное стекло с объектом;
- 4 - конденсор;
- 5 - диафрагма;
- pp_1 - главная оптическая ось

Рисунок 5. Схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла

При использовании микроскопа, апертурный угол которого 90° (это предельный угол, для которого $\sin\alpha=1$), минимальное расстояние между двумя точками при освещении объекта светом с длиной волны 550 нм для сухой системы составляет около 300 нм, а для иммерсионной системы – около 200 нм.

Таким образом, повысить разрешающую способность микроскопа можно путем:

- снижения длины волны света, проходящего через объект;
- использования иммерсионной системы;
- повышения апертурного угла до предельного (до 90°).

3.1 Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный конденсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

Микроскопия в темном поле позволяет увеличить разрешающую способность объектива примерно в 10 раз и рассматривать объекты, размеры которых находятся за пределами обычного микроскопа. *Повышение разрешающей способности достигается за счет увеличения апертурного угла.*

3.2. Фазово-контрастная микроскопия

Дает возможность изучать живые объекты без окраски и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения амплитуды световой волны (интенсивность, контрастность) и ее длины (цвет), но не воспринимает различий по фазе. В биологических препаратах чередуются места, которые в разной степени поглощают свет. Проходя через них, световые волны изменяют свою амплитуду. Такие участки объекта называют амплитудными, и под микроскопом они выглядят более темными. Прозрачные в видимом свете структурные элементы объектов пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур, но видимых изменений практически не дает. Такие препараты являются неконтрастными.

С помощью фазово-контрастного устройства фазовые изменения световых волн, проходящих через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, благодаря чему детали рассматриваемых объектов становятся видимыми и контрастными.

Фазово-контрастное устройство дает возможность изучать структуры клеток: жгутики и оболочки бактерий, ядра и митохондрии дрожжей и грибов.

Таким образом, *хотя разрешающая способность при использовании фазово-контрастной микроскопии не меняется при сравнении со светопольной, качество изображения улучшается за счет повышения контрастности.*

3.3 Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия позволяет изучать клетки в живом виде, выявлять мембранные структуры и получать высококонтрастные цветные изображения микроорганизмов.

Сущность явления люминесценции заключается в том, что некоторые молекулы структурных элементов клетки (пигменты, витамины, алкалоиды и др.) способны поглощать часть энергии падающего света определенной длины волны, переходить в электронно-возбужденное состояние и испускать свет с другой длиной волны. Источником возбуждения могут быть ультрафиолетовые лучи (300-400 нм) и видимый свет коротковолновой области спектра (400-460 нм).

Клетки микроорганизмов обладают слабой собственной (первичной) люминесценцией. Ее можно усилить предварительным окрашиванием препаратов нетоксическими красителями – флуорохромами (акридин оранжевый, нейтральный красный, аурамин, флуоресцин и др.). В результате возникает вторичная люминесценция. Для ее возбуждения достаточно использовать сине-фиолетовую часть спектра. В результате возникает высококонтрастное цветное изображение рассматриваемого объекта.

Таким образом, *при использовании люминесцентной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает по сравнению со светопольной микроскопией за счет уменьшения длины волны проходящего через объект света.*

3.4 Электронная микроскопия

Максимальная разрешающая способность оптических микроскопов составляет около 0,2 мкм и зависит от длины волны используемых лучей света. *Увеличить разрешение в 100 и более раз можно, если вместо световых или ультрафиолетовых лучей применять поток движущихся электронов, обладающих волновыми свойствами (длина волны около 0,04 нм).*

Поток электронов движется в безвоздушном пространстве от источника электронов (раскаленная нить вольфрамовой пушки) по направлению к флуоресцентному экрану и вызывает равномерное свечение его. Если же на пути электронов поместить какой-либо объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, а соответствующие места на экране окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип работы современного электронного микроскопа дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются увеличивающими стеклянными линзами. При этом используются электромагнитные линзы.

Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в оптических микроскопах: вирусы и фаги, микоплазмы, строение клеток прокариотов и эукариотов, их макро- и микроструктурные элементы. Препараты для электронной микроскопии готовят в виде очень тонких срезов на специальных ультрамикротоммах или на тончайших пленках – подложках из коллодия. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

Задание

1. Познакомиться с устройством светового микроскопа и правилами работы с ним, видами микроскопии, основными особенностями их устройства и принципами их работы.
2. Зарисовать микроскоп и отметить основные части.
3. Записать технику работы с иммерсионным объективом.

4. Посмотреть препарат микроорганизмов под микроскопом с использованием иммерсионного объектива

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные части светового микроскопа.
2. Что входит в механическую, оптическую и осветительную части микроскопа?
3. Перечислите правила работы с микроскопом.
4. Какие виды микроскопии выделяют?
5. Что такое разрешающая способность микроскопа?

Лабораторная работа № 4

Морфология бактерий, цианобактерий, дрожжей и мицелиальных грибов

Цель работы: Ознакомиться с морфологическим разнообразием микроорганизмов и основными признаками, используемыми при их идентификации.

Материалы и оборудование: Микроскоп; препараты микроорганизмов; иммерсионное масло.

Основные положения

1. **Морфология бактерий**

Бактерии объединяют обширную группу в основном одноклеточных микроорганизмов, разнообразную по форме, размерам и обмену веществ. Они являются прокариотными микроорганизмами.

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.

Основными формами бактерий, которые чаще всего встречаются, являются сферические бактерии (кокки) и палочковидные бактерии (палочки).

К основным морфологическим признакам кокков относятся их размеры (диаметр кокков в среднем составляет 1-2 мкм) и взаимное расположение. Взаимное расположение кокков определяется направлением образования перегородок при делении клеток. Если после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке, то такие формы называются монококками или микрококками. Если при делении образуются скопления, напоминающие виноградные грозди, их относят к стафилококкам. Кокки, остающиеся после деления в одной плоскости связанными парами, называются диплококками, а образующие разной длины цепочки – стрептококками. Сочетания из четырех кокков, появляющиеся после деления клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях представляют собой тетракокки. Если кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, то они образуют скопления кубической формы - сарцины. Как выглядят различные скопления кокков под микроскопом изображено на рисунке 6.

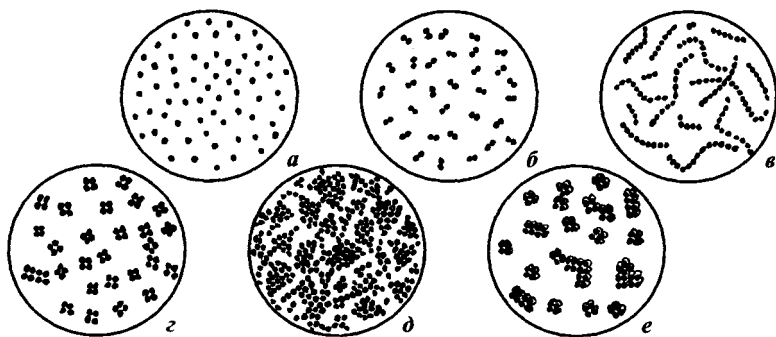


Рисунок 6. Взаимные расположения кокков: а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки; д - стафилококки; е - сарцины

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек – 2 - 7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5 - 1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*).

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен. Палочки, образующие споры называются *бациллами* и *кlostридиями*. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У кlostридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму

веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки). На рисунке 7 представлены морфологические разновидности палочковидных бактерий.

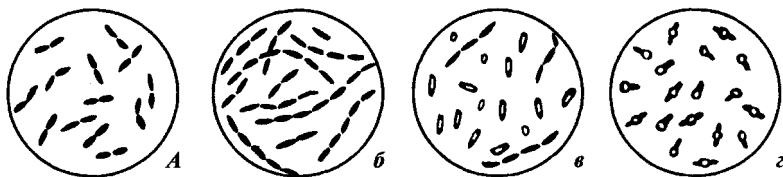


Рисунок 7. Морфология палочковидных бактерий: а - диплобактерии; б - стрептобактерии; в - бациллы; г – клостридии

При идентификации палочек диагностическое значение имеют также расположение спор в клетках бацилл и клостридий, наличие и расположение жгутиков, способность образовывать капсулы.

Бактерии могут приобретать и другие формы: извитые, кольца, пластинчатые, прямоугольные, в виде шестиугольной звезды, ветвящиеся и др.

Извитые бактерии могут быть в виде запятой — вибрионы, с несколькими завитками — спираиллы, в виде тонкой извитой палочки — спирохеты (рис.8). Извитые формы микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков.

Микобактерии — палочки с боковыми выростами (возбудители туберкулеза, паратуберкулеза). Коринебактерии напоминают микобактерии, но отличаются от них образующимися на концах утолщениями и включениями зерен в цитоплазме (дифтерийная палочка). Нитчатые бактерии — многоклеточные

организмы, имеющие форму нити. Миксобактерии скользящие микробы, по форме напоминающие палочки или веретено. Простекобактерии могут быть треугольной или иной формы. У некоторых: из них лучевая симметрия. Своё название такие организмы получили по наличию остроконечных выростов – простек. Размножаются они делением, или почкованием. Так, у треугольных форм на одной из вершин образуется почка, которая при достижении размеров материнской клетки отделяется.

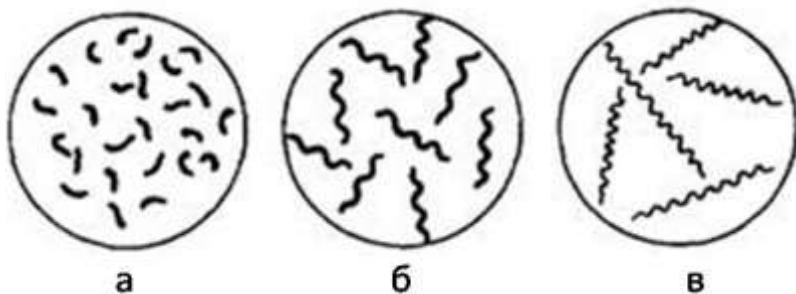


Рисунок 8. Извитые бактерии: а – вибрионы, б – спириллы, в – спирохеты

2. Морфология цианобактерий

Цианобактерии - морфологически разнообразная и полиморфная группа грамотрицательных эубактерий (рис. 9). Общие черты их морфологии заключаются только в отсутствии жгутиков и наличии слизистой оболочки (гликокаликс, состоящий из пептидогликана). Цианобактерии включают одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы.

Одноклеточные цианобактерии могут быть палочками или кокками, существующими отдельно или в виде агрегатов (колоний), в

которых они объединены капсулами или слизью. Размножение происходит исключительно бинарным делением или почкованием (хроококковые цианобактерии - *Gloeotheca* и др.). Некоторые цианобактерии могут размножаться множественным делением (плеврокапсовые цианобактерии). При этом внутри делящейся клетки появляется много маленьких клеток, так называемых беоцитов (*Dermocapsa* и др.).

Многоклеточные формы характеризуются нитчатыми объединениями клеток (трихомы). Рост осуществляется интеркалярно – путем деления клеток внутри трихомы. Трихомы могут состоять только из вегетативных клеток (нитчатые цианобактерии без гетероцист – *Lyngbya* и др.), с дифференциацией клеток с образованием гетероцист и акинетов (*Nostoc* и др.). Ветвящиеся трихомы возникают в результате разных причин, в связи с чем различают ложное и истинное ветвление. К истинному ветвлению приводит способность клеток трихома делиться в разных плоскостях, в результате чего возникают многорядные трихомы или однорядные нити с однорядными же боковыми ветвями. Ложное ветвление трихомов не связано с особенностями деления клеток внутри нити и является результатом прикрепления или соединения разных нитей под углом друг к другу.

3. Морфология микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к домену (надцарству) эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к

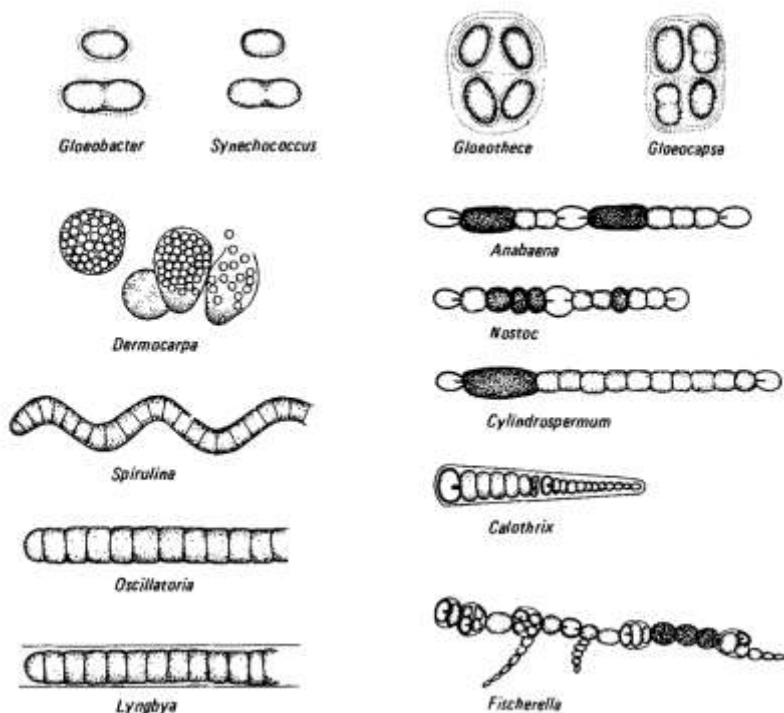


Рисунок 9. Морфология цианобактерий.

хемоорганогетеротрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами) в центре которых

имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это *ценоцитные* микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются *спорангиеносцы*, а у аскомицетов – *конидиеносцы*. Дейтеромицеты могут размножаться *многоклеточными конидиями*.

Фикомицеты и аскомицеты являются *совершенными грибами*. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к *несовершенным грибам*.

Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рис. 10.

Род *Miscor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют несептированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев (рис. 10а). Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия мукоровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

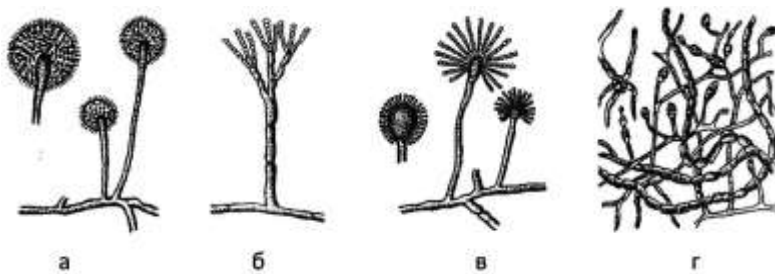


Рисунок 10. Морфологические особенности грибов различных классов:

а - *Mucor*;

б - *Penicillium*; в - *Aspergillus*; г - *Alternaria*

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы (рис. 10 б, в). Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит, что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2-3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.).

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их

концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы (рис. 10).

4. Морфология дрожжей

Дрожжи – это высшие одноклеточные грибы. Большинство дрожжей относится к двум классам грибов – аскомицетам и дейтеромицетам.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах; от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рисунке 11.

Форма и размеры дрожжевых клеток зависят от вида, возраста, питательной среды, способа культивирования.

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся

делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

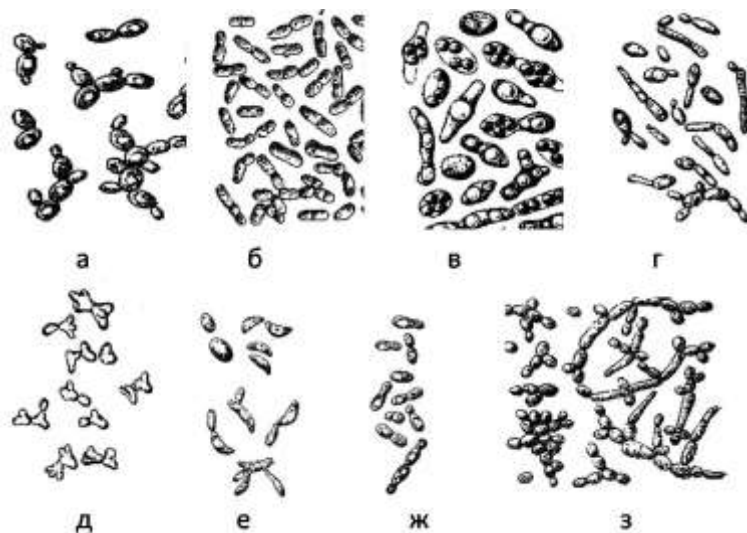


Рисунок 11. Формы дрожжевых клеток: а - овальная яйцевидная; б - цилиндрическая; в – апикулятная; лимоновидная; г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная; з – мицелиевидная

Задание

1. Ознакомиться с морфологией микроорганизмов.
2. Провести микроскопирование препаратов микроорганизмов и установить к каким морфологическим формам они относятся.
3. Наблюдаемые под микроскопом картины зарисовать и сделать заключение о морфологии исследованных чистых культур. Под

рисунками необходимо указать увеличение и подписать название изучаемого объекта.

Контрольные вопросы

1. Что учитывают при дифференциации бактерий путем микроскопии?
2. Что относится к основным морфологическим признакам кокков?
3. Какие скопления кокков различают?
4. Что относится к основным морфологическим признакам палочковидных бактерий?
5. Какие скопления выделяют у палочковидных бактерий?
6. Как при микроскопии можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий?
7. Какие особенности морфологии имеют цианобактерии?
8. Перечислите отличительные особенности грибов рода *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*.
9. Какие морфологические формы известны для дрожжей?

Лабораторная работа № 5

Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов.

Простые и дифференцированные методы окрашивания. Окраска бактерий по Граму

Цель работы: освоить технику приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов, познакомиться с простыми и дифференцированными методами окраски препаратов.

Материалы и оборудование: культуры микроорганизмов, бактериологические петли, предметные стекла, генцианфиолетовый, раствор Люголя, спирт, фуксин, вода, лоток для окраски, спиртовки, микроскоп.

Основные положения

Фиксация - обработка живого объекта, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте, сохранив его тонкую структуру. В результате фиксации клетки прочно прикрепляются к предметному стеклу и лучше прокрашиваются. В целях безопасности фиксация необходима в случае работы с патогенными микроорганизмами.

Изучение морфологии микроорганизмов в окрашенном состоянии наиболее распространенный и удобный метод в микробиологии, т.к.:

- позволяет изучить морфологические особенности микроорганизмов, найти различия между ними, а иногда и точно определить изучаемый объект;

- удобен в практической работе, т.к. значительно легче исследовать убитые микроорганизмы, чем живые;

- легко доступен благодаря простоте техники окрашивания.

1. Приготовление окрашенного препарата

1.1. Техника отбора чистых культур микроорганизмов

Отбор проб чистых культур бактерий и дрожжей, которые вырастают на поверхности плотной среды в виде мазеподобного налета или в жидкой среде ведут в следующей последовательности:

- 1) Убедиться, что у вас имеется все необходимое для работы.

- 2) Зажигают спиртовку.
- 3) Чашку с культурой (или пробирку) помещают в левую руку. Поверхность с налетом микроорганизмов должна быть обращена вверх и хорошо видна.
- 4) Петлю держат вертикально в пламени горелки и прокаливают докрасна, затем наклоняют и обжигают примыкающую к ней металлическую часть петледержателя.
- 5) Приоткрывают чашку Петри (открывают пробирку, для этого мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают к ладони наружную часть ватной пробки, вынимают ее из пробирки и держа в таком положении, не касаясь окружающих предметов, а края открытой пробки обжигают в пламени горелки).
- 6) Осторожно вводят стерильную петлю в приоткрытую чашку или пробирку с культурой и охлаждают ее о стенки пробирки или прикоснувшись к питательной среде, свободной от микроорганизмов. Затем, легким движением осторожно отбирают *небольшое* количество микробной массы с поверхности среды или каплю жидкости с клетками. Вынимая петлю из чашки или пробирки, следят за тем, чтобы отобранный материал не касался стенок, и петля не оказалась над пламенем горелки.
- 7) Закрывают чашку (или пробирку, для этого снова обжигают в пламени горелки край пробирки, затем, легким круговым движением, обжигают ватно-марлевую пробку и закрывают пробирку).
- 8) Чашку с культурой отодвигают в сторону (пробирку ставят в штатив), а извлеченный материал используют для приготовления препарата.

1.2. Приготовление мазка.

На середину чистого обезжиренного стекла (для обезжиривания стекол используют смесь эталона и серного эфира 1:1) наносят каплю воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды. При достаточном обезжиривании капля растекается равномерно и не собирается в выпуклые, медленно высыхающие пузырьки. Берут стекла пинцетом или аккуратно за грани. Прокаленной бактериологической петлей из пробирки (или чашки Петри) берут небольшое количество микробной массы и вносят каплю воды (п.1). Каплю с исследуемым материалом тщательно размазывают петлей по стеклу тонким слоем (*только при этом условии препарат удобен для изучения*) таким образом, чтобы препарат распределился на площади примерно 2-3 см².

Бактериологическую петлю прожигают на пламени горелки для стерилизации. Далее мазок сушат на воздухе при комнатной температуре или при слабом нагревании, держа препарат высоко над пламенем горелки (*сильное нагревание препарата может привести к коагуляции белков, искажающей структуру и форму клеток*). Высушенный препарат фиксируют.

1.3. Фиксация мазка.

Ее проводят над пламенем горелки при исследовании форм клеток или при помощи химических соединений для изучения внутренней структуры клеток. В первом случае препарат 3-4 раза проводят нижней стороной через наиболее горячую часть пламени горелки (*на границе светлой и темной его части*). Во втором случае используют формалин (выдерживают несколько секунд), ацетон (5 мин), этиловый (10 - 15 мин) и метиловый (2-3 мин) спирт. Для этого

фиксатор наливают на мазок или препарат погружают в фиксирующую жидкость на определенное время.

Цель фиксации:

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

1.4. Окрашивание препарата.

Механизм окраски микроорганизмов является физико-химическим процессом. Соединение микроба с краской, в большинстве случаев, является стойким и не поддается разрушению или простому вымыванию водой. Различные виды микроорганизмов по-разному реагируют с одними и теми же красителями, что свидетельствует о неодинаковом химическом составе их протоплазмы.

При окрашивании мазка препарат помещают на препаратодержатель. На мазок наносят несколько капель красителя. Продолжительность окрашивания составляет 1-5 мин в зависимости от цели окрашивания и вида красителя. По окончании окрашивания препарат промывают водой, фильтровальной бумагой удаляют воду, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

Способы окрашивания микроорганизмов делятся на простые и сложные (дифференцированные).

Простой метод окрашивания препарата.

Используют один вид красителя, например, метиленовый синий, фуксин генциан фиолетовый, в щелочных или карболовых (фенольных) растворах. При этом прокрашивается вся клетка. Метод позволяет быстро ознакомиться с общей морфологией микробов.

Дифференцированный метод окрашивания.

Метод основан на особенностях физико-химического строения клетки и применяется для детального изучения ее структуры, а также для дифференциации данного микроорганизма от других.

Используют несколько красителей, при этом отдельные структуры клетки окрашиваются разными красителями (окраска по Грамму, окраска спор и др.).

Классификация красителей:

1) *основные* и *кислые* (первые вступают в реакцию с веществами основной природы; вторые - кислотной; т.к. в белках есть и основные ($-NH_2$) кислотные ($-COOH$) группы, клеточные структуры хорошо окрашиваются и теми и другими красителями);

2) *позитивные* (окрашивают клетки микроорганизмов и другие объекты) и *негативные* (окрашивают пространство, окружающие клетки микроорганизмов, в результате клетки выглядят силуэтами на окрашенном фоне).

Для изучения внутреннего строения микробных клеток применяют специальные способы окраски - цитохимические методы исследования. Многие из этих методов используют с диагностической целью.

2. Окраска клеток микроорганизмов по Граму.

Метод основан на различии в химическом составе клеточных оболочек микробных клеток. Суть метода: в клетках одних видов

микроорганизмов образуются нерастворимые в спирте соединения йода с основным красителем, а у других видов это соединение появляется временно и после обработки спиртом растворяется. Микроорганизмы первой группы - грамположительные; второй - грамотрицательные. Поэтому все бактерии по своему отношению к этому методу делятся на две группы: окрашиваются по Граму (грамположительные, грампозитивные) и неокрашиваются (грамотрицательные, грамнегативные). Данный признак является важным в диагностике бактерий, поэтому обязательно указывается в их характеристике.

2.1. Техника окраски:

1) приготовить мазок исследуемой культуры, высушить и зафиксировать над пламенем спиртовки;

2) окрасить в течение 1-2 мин раствором генциана фиолетового (основной краситель), краситель слить в лоток (препарат водой **не промывают!**);

3) нанести на мазок 1 каплю раствора Люголя (до полного почернения мазка - 1-2мин);

4) нанести каплю спирта на **15-20с**, непрерывно покачивая стекло (при превышении указанного срока обесцвечиваются и грамположительные клетки);

5) препарат промыть водой;

6) окрасить в течение 2-3мин фуксином (дополнительный краситель);

7) препарат промыть водой (краситель смывают слабой струей до обесцвечивания смывной воды, при этом стекло держат в наклонном положении над лотком), аккуратно промокнуть

фильтровальной бумагой и исследовать под микроскопом с иммерсионной системой.

При микроскопировании грампозитивные микробы приобретают темно-фиолетовый цвет, а грамнегативные - окрашиваются в цвет дополнительного красителя - фуксина.

Задание:

- 1) приготовить и зафиксировать 3 мазка: грамположительной, грамотрицательной и неизвестной культур;
- 2) провести окрашивание всех мазков по Граму;
- 3) определить отношение исследуемой неизвестной культуры к окраске по Граму;
- 4) зарисовать препараты с клетками в рабочей тетради;
- 5) сделать выводы по работе.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается фиксация клеток в микроскопии?
2. Какие преимущества микроскопического изучения окрашенных препаратов микроорганизмов?
3. Перечислите этапы отбора чистых культур микроорганизмов и приготовления препарата для микроскопирования.
4. Какими способами можно зафиксировать клетки микроорганизмов?
5. Какие цели преследует фиксация?
6. Почему различные виды микроорганизмов по-разному реагируют с одним и тем же красителем?
7. Какие способы окрашивания микроорганизмов выделяют?
8. На какие группы делят красители?

9. На чем основан метод окраски по Граму? Как делят микроорганизмы в результате окраски по Граму?

10. Какие этапы выделяют при окраске по Граму? На что обращают особое внимание в этой технике?

Лабораторная работа № 6

Исследование микроорганизмов в живом состоянии

Цель работы: исследовать живые клетки микроорганизмов методами раздавленной и висячей капли.

Материалы и оборудование: пробирки (или чашки Петри) с культурами бактерий, микробиологические петли, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, краситель нейтральный красный или метиленовый синий (0,0001%), микроскоп, спиртовки.

Основные положения

Исследование микроорганизмов в живом состоянии применяют для выявления их подвижности, наблюдения за размножением, образованием и прорастанием спор, установления реакции микроорганизмов на химические соединения и физические факторы воздействия, изучения размеров клеток, определения запасных веществ в клетке.

Изучение микробов проводят в неокрашенном состоянии или используют «прижизненные» - **витальные** — красители. Прижизненными красителями являются метиленовый синий, нейтральный красный в концентрациях от 0,001 до 0,0001%.

Недостатками метода являются:

- 1) трудность исследования неокрашенных микроорганизмов ввиду плохой преломляемости света;
- 2) невозможность длительно сосредоточить внимание на микробе, т.к. он быстро перемещается из поля зрения.

После микроскопии живых патогенных микроорганизмов мазки **обязательно** помещают в дезинфицирующий раствор.

В живом состоянии микроорганизмы исследуют методами раздавленной и висячей капли.

1. Метод раздавленной капли

На чистое предметное стекло наносят каплю воды и исследуемого материала, перемешивают. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы под ним не образовывались пузырьки воздуха. Для этого покровное стекло берут за грани, ставят на ребро рядом с каплей и осторожно опускают, не допуская образования пузырьков воздуха. Стеклопалочкой прижимают покровное стекло к предметному и удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, поднося ее к краям покровного стекла. Жидкость должна заполнять все пространство между стеклами, но не выступать за края покровного стекла.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и просматривают препарат под микроскопом с иммерсионным объективом.

Метод удобен для исследования подвижности бактериальных клеток, изучения запасных веществ клетки и просмотра крупных объектов – микроскопических грибов и дрожжей.

2. Метод висячей капли

Требуется специальное предметное стекло с лункой посередине (рис. 12.1). На обезжиренное покровное стекло наносят каплю исследуемого материала (рис. 12.2). Покровное стекло накрывают предметным, так чтобы капля была в центре лунки предметного стекла (рис. 12.3). Предметное стекло быстро поворачивают каплей вниз (рис. 12.4). Капля должна свободно свисать в углубление, не соприкасаясь с его дном и краями. Края выемки на предметном стекле предварительно смазывают вазелином. Таким образом, капля оказывается герметически закрытой во влажной камере и защищенной от высыхания.

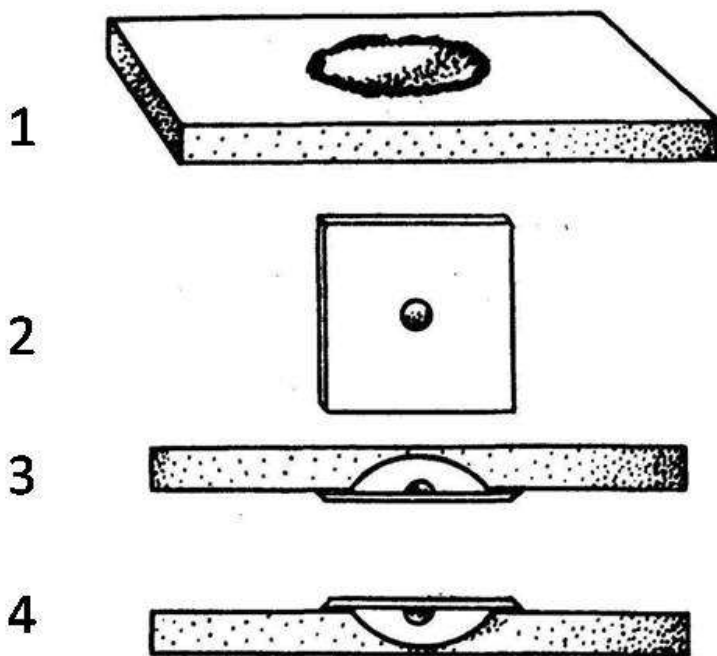


Рисунок 12. Приготовление препарата висячая капля

Задания:

1. Приготовить препарат исследуемой культуры методом раздавленной капли, окрасив его нейтральным красным (0,0001%) для лучшего изучения под микроскопом.
2. Рассмотреть препарат под микроскопом с иммерсионным объективом, отметить морфологическую форму и способность бактерий к движению, зарисовать.
3. Приготовить препарат исследуемой культуры методом висячей капли, окрасив нейтральным красным (0,0001%).
4. Рассмотреть препарат под микроскопом с иммерсионным объективом, отметить морфологическую форму и способность бактерий к движению, зарисовать.
5. Сделать вывод по работе.

Контрольные вопросы

1. Для каких целей исследуют микроорганизмы в живом состоянии?
2. Какие красители относят к витальным?
3. Каковы недостатки методов исследования микроорганизмов в живом состоянии?
4. Какие методы исследования микроорганизмов в живом состоянии выделяют?

Лабораторная работа № 7

Споры бактерий

Цель работы: освоить технику окрашивания спор у бактерий.

Материалы и оборудование: пробирки с культурами спорообразующих бактерий, микробиологические петли, предметные

стекла, красители - метиленовый синий Леффлера, нейтральный красный (0,5%), микроскоп, спиртовки.

Основные положения

Для многих бактерий характерно образование эндогенной споры. Споры образуются при неблагоприятных внешних условиях существования бактерий (высыхание, недостаток питательных веществ, неблагоприятная температура, наличие вредных продуктов обмена и др.). Они представляют собой округлые, овальные или эллипсоидные образования. По мере образования споры клетка постепенно отмирает. Но в благоприятных условиях спора вновь прорастает в вегетативную форму. Спора является защитным приспособлением для сохранения вида в измененных условиях среды, она чрезвычайно стойка и требует специальных способов окраски.

Спорообразование присуще бациллярным формам, но не коккам и спириллам. Если диаметр споры не превышает диаметра клетки, в которой спора образуется, клетку называют *бациллярной* (рис. 13). В бациллярной клетке спора может располагаться:

- 1) центрально (палочка сибирской язвы);
- 2) на конце - терминально (палочка столбняка);
- 3) ближе к одному из концов - субтерминально (палочка ботулизма).

Если спора превышает диаметр клетки, то в зависимости от ее расположения:

- в центре – клетку называют *кlostридиальной* (рис. 14);
- на конце клетки – *плектридиальной*.

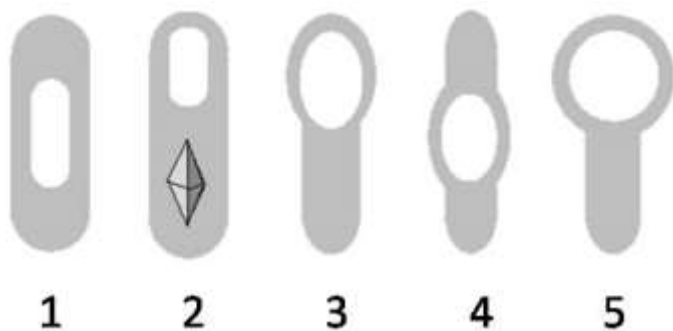


Рисунок 13. Расположение эндоспор: 1 - бацилярное центральное, 2 - бацилярное терминальное, 4 – клостридиальное, 3 и 5 - плектридиальное

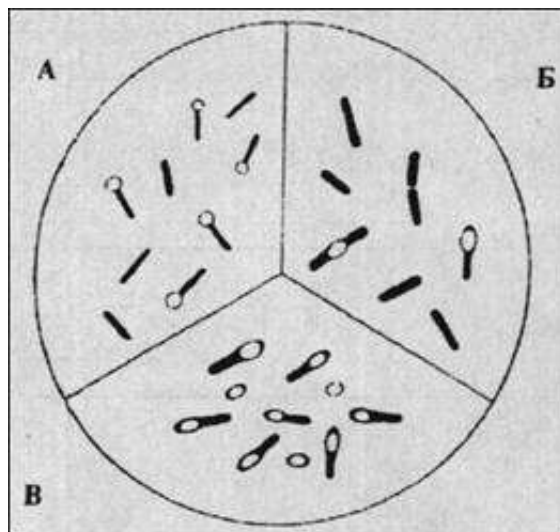


Рисунок 14. Клостридии: А – *Clostridium tetani* (барабанные палочки);
Б – *Clostridium perfringens*; В – *Clostridium botulinum* (теннисные ракетки)

Споры с трудом вступают в физико-химические реакции с различными веществами, в т.ч. и красками. Поэтому в препаратах, окрашенных простыми способами или по Граму, споры остаются бесцветными.

Все способы окраски спор основаны на едином принципе: сначала споры протравливают различными веществами: хромовой, соляной, серной, уксусной кислотами, аммиаком, гидроксидом натрия, перекисью водорода (для размягчения оболочки), затем окрашивают клетку со спорой при нагревании и, далее, обесцвечивают цитоплазму и дополнительно окрашивают ее контрастным красителем.

1. Окраска препарата методом Циля-Нильсена в модификации Мюллера

1. Приготовить и зафиксировать препарат исследуемой культуры.
2. Нанести на препарат 5% раствор хромовой кислоты на 5-10 минут. Смыть водой.
3. Накрыть препарат полоской фильтровальной бумаги. Обильно смочить бумагу карболовым фуксином Циля. Подогреть препарат над пламенем до появления паров (не до кипения), добавить новую порцию красителя. Процедуру проводить в течение 7 минут, следя, чтобы краситель испарялся, но бумага не подсыхала.
4. Бумагу снять, препарат охладить и промыть водой. Подсушить фильтровальной бумагой.
5. Для обесцвечивания цитоплазмы клеток препарат обработать 1% раствором соляной или серной кислот в течение 15-30 с.
6. Препарат промыть водой и окрасить метиленовым синим в течение 2 мин.

- 7.Препарат микроскопировать с иммерсионным объективом. Окраска получается контрастной: ярко-красные споры четко выделяются на голубом фоне цитоплазмы.

2. Окраска препарата методом Пешкова

- 1.На фиксированный препарат налить метиленовый синий Леффлера, довести его до кипения и кипятить 15-20 с.
- 2.Препарат промыть водой.
- 3.Докрасить препарат 0,5% водным раствором нейтрального красного в течение 30 с.
- 4.Препарат промыть водой, подсушить.
- 5.Препарат микроскопировать с иммерсионным объективом. Окраска получается контрастной: споры окрашиваются в голубой или синий цвет, цитоплазма – в розовый.

Задания

1. Приготовить препарат споросодержащих бактерий и окрасить его методом Пешкова или методом Циля-Нильсена.
2. Препарат зарисовать и сделать вывод по работе.

Контрольные вопросы

1. Почему бактерии образуют споры?
2. Какие бактерии могут образовывать споры?
3. Как подразделяют бактерии в зависимости от расположения споры?
4. Как могут располагаться споры внутри клетки? Приведите примеры микроорганизмов.
5. В чем заключается трудность обнаружения спор у бактерий?
6. Какой принцип положен в основу окраски спор бактерий?

РАЗДЕЛ 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Лабораторная работа № 8

Питательные среды для культивирования микроорганизмов.

Приготовление питательных сред различного состава

Цель работы: познакомиться с классификацией и назначением питательных сред, овладеть навыком приготовления различных питательных сред.

Материалы и оборудование: стеклянные колбы различного объема, весы технические и аналитические, компоненты питательных сред.

Основные положения

Микроорганизмы так же, как и любой другой живой организм для роста и размножения нуждаются в питательных веществах, которые содержит субстрат. В микробиологии культивирование микроорганизмов происходит с использованием питательных сред разных по составу. Состав питательной среды определяется потребностями микроорганизма в питании или задачами эксперимента.

Питательная среда должна содержать:

- доступный для клетки источник энергии (для фототрофов – свет, для остальных – органический или неорганический субстрат);
- все необходимые компоненты для реализации конструктивных процессов.

Необходимые компоненты:

- 1) источник углерода (CO_2 , углеводы, кислоты, спирты);
- 2) источник азота (молекулярный азот воздуха, неорганические соли азота, аминокислоты);
- 3) факторы роста (пурины, пиримидины, аминокислоты, витамины);
- 4) макроэлементы – калий, натрий, магний, кальций, железо и др.;
- 5) микроэлементы – молибден, цинк, медь, кобальт и др.

Растворы микроэлементов, аминокислот и витамины стерилизуют отдельно и вносят в среду непосредственно перед посевом.

1. Классификация питательных сред

1.1. По составу

По составу все питательные среды делятся на натуральные (естественные), синтетические и полусинтетические.

Натуральные (естественные) – состоят из продуктов животного и (или) растительного происхождения (мясо, молоко, разведенная кровь, картофель, морковь и т.д.). Эти среды богаты органическими веществами, однако имеют сложный и непостоянный состав, поэтому малоприспособлены для исследования обмена веществ микроорганизмов.

К естественным питательным средам относятся:

– мясопептонный бульон (МПБ) – состоит из экстракта мяса (500 г мяса на 1 л воды, экстракция 12 ч при комнатной температуре), 0,5 % NaCl и 1 % пептона (продуктов неполного разложения белка). Для приготовления мясопептонного агара (МПА) к бульону добавляют агар-агар (1,5 - 2%), стерилизуют при 2 атм 20-30 мин;

– неохмеленное пивное сусло, готовится на основе солода (проросшего ячменя), гидролизованного до сахаров, стерилизуют при 1,5 атм 20-30 мин;

– дрожжевая среда: экстракт дрожжей (7-10 г на 1 л воды), 1-2 % раствор сахарозы (глюкозы или фруктозы), 0,1 % K_2HPO_4 , 0,5 % NaCl, стерилизуют при 1,5 атм 20-30 мин;

– картофельный агар (отвар 200 г картофеля на 1 л воды с добавлением агар-агара), стерилизуют при 2 атм 40-45 мин.

На натуральных средах хорошо развиваются все микроорганизмы, т.к. эти среды содержат все необходимые для роста компоненты, однако их состав химически непостоянен и зависит от свойств биологического объекта, из которого они изготовлены.

Полусинтетические – наряду с компонентами естественного происхождения содержат химические вещества, полученные синтетическим путем. К таким средам относится МПА с добавлением глюкозы и K_2HPO_4 , искусственные среды с добавлением факторов роста (дрожжевого автолизата, кукурузного экстракта и т.д.).

Среда LB (Лурия – Бертрани): триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, вода – 1 л; стерилизуют при 1,5 атм 20-30 мин.

Синтетические – это комплекс определенных химически чистых соединений, взятых в точно указанных концентрациях. Они наиболее удобны для изучения метаболизма микроорганизмов.

К синтетическим питательным средам относятся:

- среда Чапека (для культивирования грибов): глюкоза – 30 г, $NaNO_3$ – 2 г, K_2HPO_4 – 1 г, $MgSO_4$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4$ – 0,01; вода – 1 л; стерилизуют при 1,5 атм 20-30 мин;

- среда Канеда (для культивирования метилотрофов): KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г, NaCl 0,5 г, MgSO_4 – 0,025 г, FeSO_4 – 0,01 г, вода – 1 л; стерилизуют при 2 атм 20-30 мин; после стерилизации в среду вносят 0,3% стерильного метанола (стерилизуют фильтрованием).

- среда Эванса (для культивирования псевдомонад): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 8,71 г растворить в 800 мл воды, довести pH до 7,00. Добавить по 1 мл следующих растворов:

- 5 М р-р NH_4Cl (можно заменить NH_4NO_3)
- 0,1 М р-р Na_2SO_4
- 62 мМ р-р MgCl_2
- 1 мМ р-р CaCl_2
- 0,005 мМ р-р $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
- микроэлементы (10 мл HCl + 990 мл H_2O дист. + 0,41 г ZnO + 5,4 г $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 2,00 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ + 0,17 г $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,48 г $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 0,06 г H_3BO_3)

Довести объем среды до 1 л дистиллированной водой.

1.2. По назначению

По назначению питательные среды делятся на:

Элективные среды – обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и малоприспособны (неприспособны) для культивирования других. Обычно их применяют на первом этапе выделения микроорганизмов из естественных субстратов для получения накопительных культур (например, среда Эшби для рода *Azotobacter*).

Дифференциально-диагностические (индикаторные) – предназначены для того, чтобы быстро отличить одни виды

микроорганизмов от других (например, среда Эндо для бактерий группы кишечной палочки).

- Среда Эндо: пептон - 10 г/л, лактоза - 10 г/л, K_2HPO_4 - 2,5 г/л, фуксин - 0,3г/л, Na_2SO_3 - 0,5г/л, агар- 12 г/л.

Универсальные - среды, на которых хорошо растут многие патогенные и непатогенные виды микроорганизмов (например, среда Лурия-Бертрани).

1.3. По физическому состоянию

По физическому состоянию среды делят на:

Плотные среды (на основе агара, желатина или силикагеля) – предназначены для выделения чистых культур микроорганизмов, диагностических целей, для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения антагонистических свойств.

Агар-агар представляет собой полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Получают из морских бурых или красных водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата. В воде агар-агар образует гель, плавящийся при 100 °С и затвердевающие при температуре 40-45 °С. В количественном соотношении агар, как правило, составляет 1,5-2 % от состава среды (15-20 г/л). Его можно вносить в уже готовые среды и нагревать до расплавления.

Желатин – белок животного происхождения, получаемый при вываривании костей и хрящей животных. Он плавится при температуре 23-26°С. В составе сред желатин составляет 10-15 % (100-150 г/л).

Кремнистый гель (силикагель) – вещество неорганического происхождения, использующееся как основа для плотных

синтетических сред. Его используют в случаях, когда требуются плотные среды, не содержащие органических компонентов (для хемолитотрофов). Силикагелем называют двуокись кремния (SiO_2). Его стерильный золь готовят из раствора силиката натрия или калия (Na_2SiO_3 , K_2SiO_3) и перед использованием, для того чтобы вызвать образование геля, к нему добавляют питательную среду, содержащую электролиты. Среда на основе силикагеля (1,5–2,0 %) используют для получения культур автоотрофных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества. При добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно исследовать возможность использования их в качестве единственных источников углерода гетеротрофными бактериями. С помощью силикагелиевых сред также можно определять потребности бактерий в витаминах.

Жидкие среды – предназначены для выявления физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, накопления биомассы и продуктов метаболизма, поддержания и хранения микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Полужидкие среды – получают добавлением к жидким средам 0,5% агара. Используют для специальных целей, например для культивирования анаэробов.

Сыпучие среды – применяются в промышленной микробиологии (разваренное пшено, отруби, песок, пропитанные питательным раствором).

Задание:

Приготовить жидкие и плотные питательные среды по выбору преподавателя. Колбы со средами закрыть фольгой и бумагой,

зафиксировать их резинкой, подписать (название среды, номер группы, дата приготовления) и сдать на стерилизацию.

Варианты:

1) приготовить жидкую и агаризованную питательную среду Лурия – Бертрани (LB) объемом 300 мл в термостатированных колбах;

2) приготовить жидкую питательную среду Канада объемом 100 мл в термостатированных колбах;

3) приготовить жидкую и агаризованную питательную среду Эванса объемом 300 мл в термостатированных колбах;

4) приготовить агаризованную питательную среду Чапека объемом 100 мл;

5) приготовить среду Эндо объемом 100мл.

Контрольные вопросы

1. Какие основные компоненты должна содержать питательная среда?
2. На какие группы делят питательные среды по составу? Приведите примеры.
3. На какие группы делят питательные среды по назначению? Приведите примеры.
4. В чем различие элективных сред от дифференциально-диагностических?
5. На какие группы делят питательные среды по физическому состоянию? Приведите примеры.
6. Какие вещества используют для приготовления плотных питательных сред? Дайте характеристику этих веществ.

Лабораторная работа № 9

Значение отдельных элементов питания в развитии микроорганизмов

Цель работы: выяснить влияние отдельных элементов питания на рост и развитие плесневого гриба.

Материалы и оборудование: культура гриба, сахароза, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , KCl , NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 7 колб для культивирования на 250 мл, цилиндры на 100 мл, микробиологическая петля, спиртовка, весы.

Основные положения

Для роста микроорганизмов необходимы питательные вещества. *Питательные вещества* - это растворенные в воде соединения, из которых микроорганизмы строят свои клетки и получают энергию. Требования, предъявляемые различными микроорганизмами в отношении состава питательной среды и прочих условий, весьма разнообразны. В связи с этим было предложено много рекомендаций по составлению питательных сред для различных микроорганизмов. Однако питательные среды должны отвечать следующим минимальным требованиям: в них должны присутствовать все элементы, из которых строится клетка, в такой форме, в которой микроорганизмы способны их усваивать.

1. Потребность в химических элементах.

По количественному вкладу в построение клетки различают *макро- и микроэлементы*. К первым относятся десять элементов,

содержащихся во всех организмах: углерод, кислород, водород, азот, сера, фосфор, калий, кальций, магний и железо (C, O, H, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe). Микроэлементы, или следовые элементы, - это марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, ванадий, бор, хлор, натрий, селен, кремний, вольфрам и другие, в которых нуждаются не все организмы.

Задание

1). Приготовить питательные среды по вариантам:

1- Полная питательная среда без микроэлементов:

сахароза – 10%

NH_4NO_3 – 0,3%

KH_2PO_4 – 0,2%

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1%

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01%

2 - Та же среда без углерода (исключить сахарозу).

3 - Та же среда без азота (исключить NH_4NO_3).

4 - Та же среда без фосфора. (KH_2PO_4 заменить другой солью, например, KCl. При замене одного компонента среды другим следует рассчитать эквивалентный процент замещающего вещества).

5 - Та же среда без калия. (KH_2PO_4 заменить NaH_2PO_4 . При замене следует рассчитать эквивалентный процент замещающего вещества).

6 - Та же среда с добавлением микроэлементов ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01%).

7 - Та же среда с добавлением микроэлементов (H_3BO_3 – 0,01%).

2). Каждый вариант питательной среды необходимо приготовить в количестве 100 мл. Для этого объем среды в колбе довести дистиллированной водой до 100 мл и тщательно все перемешать.

- 3). Колбы с готовой средой заразить спорами гриба, закрыть ватно-марлевыми пробками, указать номер варианта.
- 4). Колбы поместить в термостат при 24-26 °С на 7 суток.
- 5). Пленка гриба, выросшая в первом варианте, принимается в качестве образца, с ней сравнивают все остальные. При сравнении полученных результатов пользуются условными обозначениями: отсутствие роста или спорообразования (-); слабый рост или спорообразование (+); умеренный рост или спорообразование (++); обильный рост или спорообразование (+++). Результаты занести в таблицу 3.
- 6). Сделать выводы.

Таблица 3. Результаты наблюдений

Элемент питания	Рост гриба	Толщина мицелия, мм	Интенсивность спорообразования
Полная среда			
Без источника углерода			
Без источника азота			
Без источника фосфора			
Без источника калия			
Добавление соли цинка			
Добавление борной кислоты			

Контрольные вопросы

1. Дайте определение термина «питательные вещества».
2. Каким минимальным требованиям должны отвечать все питательные среды?
3. Какие элементы относятся к макроэлементам, а какие к микроэлементам?

РАЗДЕЛ 4: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 10

Культивирование анаэробных микроорганизмов

Цель работы: познакомиться с техникой культивирования анаэробов, выделение сульфитредуцирующих клостридий из воды природных водоемов

Материалы и оборудование: стерильные пробирки на 30 мл, агаризованная питательная среда LB, сульфита натрия, сульфат железа (II), пипетки, стерильные наконечники, вода из природного источника.

Основные положения

По способу дыхания микроорганизмы разделяются на аэробов и анаэробов. *Аэробы* используют для дыхания свободный кислород по типу дыхания высших растений. *Анаэробные* микроорганизмы не нуждаются в свободном кислороде, который для них является ядом, но им нужен кислород в связанном состоянии. Необходимую энергию анаэробы получают расщеплением веществ, содержащих большой запас скрытой энергии. Некоторые микроорганизмы, приспосабливаясь к окружающим условиям, способны менять аэробный тип дыхания на анаэробный и обратно. Это *факультативные микроорганизмы*, т.е. *условные анаэробы*. Другие микробы способны жить только в отсутствии свободного кислорода, он для них токсичен - *облигатные*, т.е. *обязательные анаэробы*.

1. Методы культивирования анаэробов

Выделяют следующие методы культивирования анаэробов:

1. Посев анаэробной культуры уколом в высокий столбик сахарного агара. Это наиболее простой способ.

2. Добавление в среду редуцирующих веществ. Чаще всего используется среда Кита-Тароцци (бульон с 0,5% глюкозой и кусочками свежих органов животных). Кусочки органов обладают редуцирующей способностью. Среду заливают сверху слоем масла. Питательные среды перед посевом анаэробов «регенерируют», кипятят для удаления из них кислорода. После посева их заливают сверху слоем парафинового или вазелинового масла.

3. Удаление воздуха из среды механическим способом. Используют специальные приборы – анаэростаты (рис. 15), из которых воздух выкачивается насосом.



Рисунок 15. Анаэростат

4. Замена воздуха индифферентным газом, например, водородом, который получают в аппарате Кипа и через трубку направляют в сосуд, где помещены посевы анаэробов.

5. Биологический – комбинированный посев анаэробов и аэробов. Посев производят на чашку с толстым слоем плотной питательной среды, разделенного пополам вырезанной посредине чашки прокаленным стерильным скальпелем небольшой полоской. На одной половине агара делают посев культуры аэроба, на другой – анаэроба. Чашку обмазывают парафином и помещают в термостат. Сначала происходит рост аэроба, когда они в достаточной мере исчерпают из чашки кислород, начинается рост анаэробов.

Существуют и другие способы культивирования анаэробов.

2. Выделение сульфитредуцирующих клостридий из воды природных водоемов.

Сульфатредуцирующие клостридии, преимущественно *Clostridium perfringens*, - спорообразующие анаэробные палочковидные микроорганизмы, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре при температуре 44⁰С в течение 24-х часов.

Железо-сульфитный агар

В 1л стерильного расплавленного питательного агара (Среда LB (Лурия – Бертрани): триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl– 5 г, агар – 20 г, вода – 1 л) добавляют 10г глюкозы, нагревают до расплавления, разливают мерно во флаконы, автоклавируют при 112 °С 12 минут. 20% раствор Na₂SO₃ и 8% раствор FeSO₄ готовят непосредственно перед употреблением в стерильной посуде на стерильной дистиллированной воде. Раствор Сульфита натрия

нагревают до полного растворения. Перед выполнением анализа в 100 мл расплавленной основной среды вносят 5 мл 20% раствора сульфита натрия, перемешивают, затем вносят 1 мл 8% раствора сернокислого железа, перемешивают и разливают с соблюдением правил стерильности в стерильные пробирки высоким столбиком (12-15 см).

Для выделения *Clostridium perfringens* из природных источников (водоемов, почв) пробы предварительно прогревают на водяной бане при температуре 75 °С в течение 15 мин для исключения вегетативных форм. В пробирки разливают по 5 мл воды и заливают горячим 75-80 °С железо-сульфитным агаром в количестве, превышающем объем воды в 2 раза. Среду заливают по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха. После этого пробирку быстро охлаждают, помещая ее в емкость с холодной водой для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при 44 °С в течение 24-х часов.

Задания

1. Приготовить 50 мл железо-сульфитного агара.
2. Пробу воды 20 мл прогревают на водяной бане в пробирках при температуре 75°С в течение 15 мин.
3. В 4 стерильные пробирки (объем пробирок не менее 15 мл) вносят по 5 мл воды. Посевы заливают горячим 75-80 °С железо-сульфитным агаром.
4. Пробирки быстро охладить и инкубировать при 44°С в течение 24-х часов.
5. На следующем занятии записать наблюдения.
6. Сделать выводы

Контрольные вопросы

1. Дайте определение терминам "аэробные микроорганизмы", "анаэробные микроорганизмы", "факультативные микроорганизмы", "облигатные микроорганизмы".
2. Какие методы культивирования анаэробов выделяют?
3. Какой метод применяют для выделения *Clostridium perfringens* из природных источников?

Лабораторная работа № 11

Выделение чистой культуры бактерий

Цель работы: получить чистые культуры бактерий различными способами.

Материалы и оборудование: чашки Петри с плотной питательной средой (LB), микробиологические петли, шпатель Дригальского, автоматическая пипетка, исследуемые культуры бактерий на жидкой и твердой питательных средах, спиртовки.

Основные положения

Чистой (аксенической), называют культуру, содержащую микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры – необходимые условия работы с микроорганизмами.

Выделение чистой культуры включает следующие этапы:

- 1) получение накопительной культуры;
- 2) выделение чистой культуры;

3) определение чистоты выделенной культуры.

Накопительная культура – культура, в которой преобладают представители одной физиологической группы или даже одного вида микроорганизмов. Для ее получения необходимо создать избирательные (элективные) условия, обеспечивающие преимущественное развитие желаемых микроорганизмов из смешанной популяции.

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

1. Выделение из отдельной колонии.

1.1. Метод Р. Коха

Накопительную культуру аэробов наносят пипеткой на поверхность плотной среды и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю по поверхности среды. Далее этим же шпателем, не стерилизуя его, протирают поверхность среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно, в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, в последующих – рост изолированных колоний (рис. 16).

1.2. Метод истощающего штриха

Накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной питательной среды (рис. 17) проводят штрихи в порядке, указанном на рисунке 18. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки.

После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода (в случае ее образования на крышке) не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1-7 суток в зависимости от

скорости роста микроорганизмов. Выросшие изолированные колонии (рис. 19) отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду.

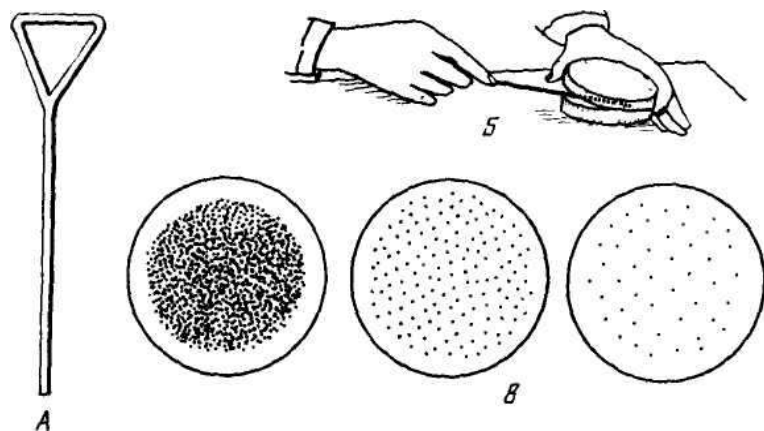


Рисунок 16. А - шпатель Дригальского; Б - посев микроорганизмов с помощью шпателя Дригальского; В - рост микроорганизмов после посева

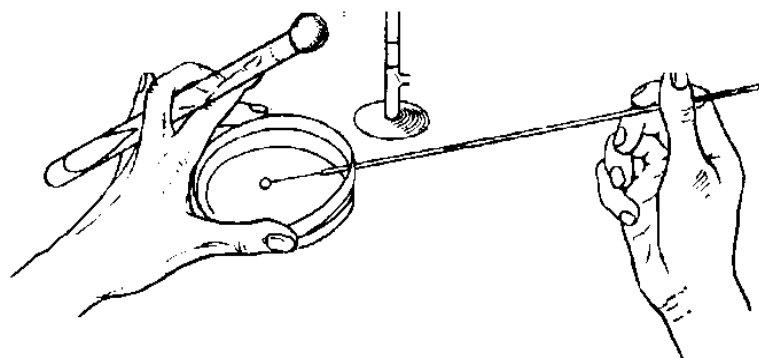


Рисунок 17. Посев микроорганизмов на плотные питательные среды с помощью микробиологической петли.

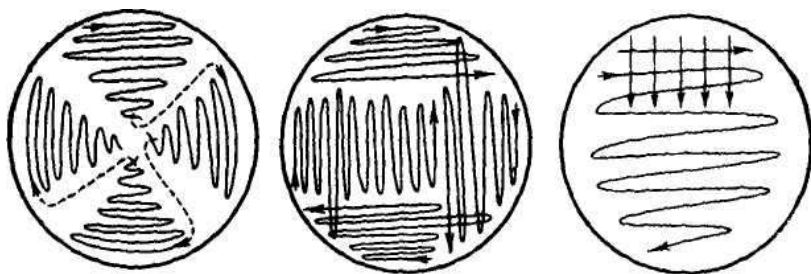


Рисунок 18. Схема последовательности посева культуры микроорганизмов на поверхность твердой питательной среды



Рисунок 19. Изолированные колонии бактерий, полученные методом истощающего штриха

1.3. Метод глубинного посева

Изолированные колонии микроаэрофилов и факультативных анаэробов получают методом глубинного посева. Для этого плотную питательную среду предварительно разливают в пробирки по 15-20 мл и стерилизуют. В остывшую до 48 – 50 °С среду вносят 0,5 – 1,0 мл предварительно сделанного разведения накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями и далее, быстро выливают в чашку Петри, сохраняя стерильность. Чашки помещают в термостат. Колонии, выросшие в толще среды, вырезают стерильным скальпелем или извлекают петлей и переносят в жидкую среду.

2. Выделение из одной клетки

2.1. Капельный метод

Используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, микроскопическими грибами, цианобактериями. Накопительную культуру разводят в стерильной среде так, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Далее на поверхность нескольких стерильных покровных стекол наносят по капле приготовленного разведения. Готовят препараты «висячая капля». Капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. Препарат помещают в термостат во влажную камеру (чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой). Через 24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Там, где наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками фильтровальной бумаги и переносят в пробирки с питательной средой.

2.2. С помощью микроманипулятора

Микроманипулятор – прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки извлекать из суспензии одну клетку (рис.20). Эту операцию контролируют под микроскопом.

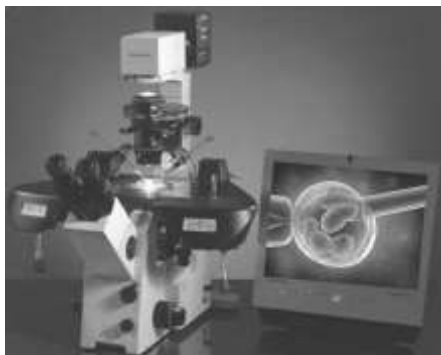


Рисунок 20. Микроманипуляторная система IntegraTi, разработанная фирмой ResearchInstruments

Чистоту выделенной культуры проверяют несколькими способами:

- визуально (просматривают рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды – если рост не однороден, культура загрязнена);
- микроскопическим контролем (готовят препарат фиксированных окрашенных клеток и просматривают его с иммерсионной системой);
- высевом на ряд питательных сред (сусло, МПБ, картофельный агар и др.).

Задания:

1. Изучить методы выделения чистой культуры.
2. Выделение чистой культуры методом Коха

- Разлить в 4 стерильные чашки Петри питательную среду.
 - Внести в 1 чашку 50мкл суспензии накопительной культуры и стерильным стеклянным шпателем растереть культуру по поверхности чашки.
 - Не стерилизуя шпатель, провести им последовательно по поверхности 2, 3 и 4 чашек.
3. Выделение чистой культуры методом истончающего штриха
 - Подготовить чашки с твердой питательной средой.
 - Микробиологической петлей взять небольшое количество культуры и по поверхности чашки со средой провести штрихи, как показано на рисунке 17.
 4. Чашки поставить в термостат для инкубации при температуре 28 °С на 24 – 48 часов.
 5. Через 24 – 48 часов культивирования записать полученные результаты по двум методам.
 6. Сделать вывод.

Контрольные вопросы

1. Что называют чистой культурой?
2. Какие этапы включает выделение чистой культуры?
3. Какую культуру называют накопительной?
4. Какие методы выделения чистой культуры из отдельной колонии известны? В чем они заключаются?
5. Какие методы выделения чистой культуры из отдельной клетки известны?
6. Как проверить чистоту выделенной культуры?

Лабораторная работа № 12

Фазы роста микробиологических культур и расчет кинетических параметров роста

Цель работы: знакомство с циклом развития микробных культур и спецификой фаз периодической культуры, обучение технике культивирования микроорганизмов в режиме периодического процесса и расчет основных кинетических параметров роста.

Материалы и оборудование: культуры микроорганизмов, необходимые компоненты для приготовления питательных сред, пипетки, пробирки, колбы для выращивания бактерий, чашки Петри; термостатируемая качалка, термостат.

Основные положения

В зависимости от способа подачи питательных веществ и отбора получаемых продуктов выделяют два основных способа культивирования: периодическое и непрерывное.

1. Периодическое культивирование.

Периодическим (стационарным) называют такой метод культивирования, когда клетки микроорганизмов вносят в питательную среду и далее компоненты среды не поступают в сосуд и не удаляются из него.

Периодическое культивирование микроорганизмов представляет с точки зрения техники наиболее простой метод культивирования. Под культивированием микроорганизмов понимают их выращивание в наиболее благоприятных (оптимальных) условиях.

При периодическом способе культивирования питательная среда засеивается исходной культурой продуцента - инокулятом (от лат. *inoculatio* – прививка). Инокулят иначе называют посевным материалом, а инокуляцию называют посевом. Далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов. Поскольку при периодическом способе культивирования микроорганизма всегда имеет место некоторая неустойчивость в системе.

В простой гомогенной периодической культуре все ее части находятся в одинаковых условиях. Для феноменологического описания роста микроорганизмов в периодическом режиме обычно используют кривую роста (рис. 21). Она имеет S-образный характер. Различные фазы роста такой культуры отражают изменения в биомассе и в окружающей среде. Продолжительность каждого периода зависит от вида культуры, количества и качества посевного материала, состава питательной среды и условий культивирования.

Периодическая культура начинается с *лаг-фазы*, которая является совершенно необязательной фазой роста. Ее возникновение зависит от несоблюдения оптимальных условий для роста посевного материала. Происходит перепад концентраций элементов питания, особенно углеродного, от сниженных – в выросшей культуре, из которой берется посевной материал, к высоким – в свежей среде. В этот период культура как бы адаптируется (привыкает) к новой среде обитания. Истощенные клетки старого посевного материала должны

перейти из состояния голодания или отравления в состояние, соответствующее способности к размножению, которое определяется необходимым количеством и состоянием рибосом, способностью и условиями к репликации, синтезу клеточной стенки и т. п. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма, состава посевной и производственной сред и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевная доза, тем короче I фаза роста.

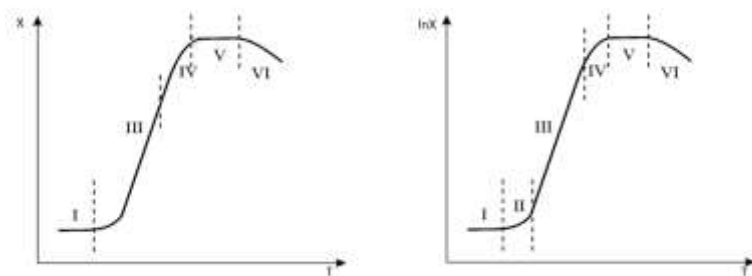


Рисунок 21. Фазы на кривой роста периодической культуры: I – лаг-фаза; II – фаза ускорения роста; III – фаза экспоненциального роста; IV – фаза замедления роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания.

II фаза называется *фазой ускорения роста*, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Далее следует *экспоненциальная фаза*, в наибольшей степени характеризующая и выражающая способность культуры к размножению. В этой фазе сведены к минимуму все лимитирующие и ингибирующие влияния. Компоненты питательной среды имеются в избытке, продукты обмена еще не накопились. Рост идет с

максимально возможной скоростью, генетически заложенной в клетке, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколений постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени. Если же среда по своему начальному составу не оптимальна, то рост будет ограничен неподходящим питанием или неоптимальным значением pH и т. п. В этом случае рост может быть описан более пологой экспонентой или прямой. Эта фаза в лабораторных условиях не может быть длительной, так как даже не очень плотная популяция вскоре начнёт испытывать недостаток в кислороде из-за его быстрого поглощения и слабой растворимости.

Фаза замедления роста может быть очень разнообразной и самой сложной. Она может полностью отсутствовать на простых синтетических средах, когда рост сразу останавливается из-за отсутствия одного элемента питания, в особенности – источника углерода и энергии. Рост клеток прекращается, и наступает стационарная фаза, в данном случае – фаза голодания по использованному элементу питания. Возникает и пространственная ограниченность, клетки мешают друг другу, уменьшаются поверхности их контакта со средой, ухудшаются поступление питательных веществ внутрь клетки и выброс продуктов метаболизма. На сложных средах, содержащих несколько источников углерода, может происходить поочередная их утилизация и постепенное замедление роста. При избытке питания рост замедляется из-за накопления продуктов метаболизма. Токсичные продукты метаболизма у микроорганизмов весьма разнообразны. Возможно одновременное отравление и голодание. В соответствии с этим и стационарная фаза может содержать самые разнокачественные клетки: живые, но голодающие,

живые, но ингибированные, отмирающие по причине голодания или отравления.

Стационарная фаза не характеризует культуру, так как в этот период состояние клеток может быть самым разнообразным. Масса и количество всех живых клеток во время этой фазы достигают своего максимума. Количество вновь образовавшихся клеток становится на этом этапе равным количеству клеток, отмерших и автолизовавшихся. В какой-то момент это равновесие нарушается, и количество отмерших клеток становится больше вновь образовавшихся, наступает VI фаза – *фаза отмирания*. На этой стадии масса живых клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

Только экспоненциальная фаза до некоторой степени характеризует свойства культуры.

Таким образом, клетки периодической культуры претерпевают значительные изменения всех свойств по всему периоду роста, обусловленные непрерывными изменениями окружающей среда и быстрой реакцией на них клеток. Тем не менее, периодические методы культивирования микроорганизмов широко используются в настоящее время в промышленной биотехнологии и исследовательской практике. Техника периодической культуры позволяет получить исходные данные, и расходные коэффициенты, и кинетические характеристики культуры, необходимые для перехода к проточным системам и масштабированию процесса.

2. Непрерывное культивирование

Непрерывное культивирование – это процесс, происходящий в так называемой открытой системе, все компоненты которой могут поступать в систему и покидать ее. Непрерывное культивирование микроорганизмов, когда происходит, с одной стороны, приток

питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, чаще используется при промышленном получении различных продуктов микробного синтеза. Культивирование микроорганизмов в производственных целях связано с особенностями роста и функций микроорганизмов. Это могут быть культуры, крайне различные по форме и сложности. Простейшей формой культуры является гомогенная суспензия микроорганизмов одного вида в определенном объеме водной среды, поддерживаемая в постоянных физических условиях и содержащая минимальное число определенных компонентов: источник углерода, азота, фосфора и других элементов. Процесс непрерывного культивирования осуществляется в специальных аппаратах – *ферментерах*.

Скорость разбавления (коэффициент разбавления или скорость протока) D рассчитывается по уравнению:

$$D = F/V, \quad (1)$$

где F – скорость поступления питательной среды, л/ч, V – объем ферментера.

Величина D соответствует объему среды, прошедшей через ферментер за 1 ч, обратная величина $1/D$ показывает время пребывания микроорганизмов в ферментере.

Контроль и управление процессами непрерывного культивирования осуществляется двумя путями: хемотростным и турбидостатным.

2.1. Хемотростное культивирование

Хемотрост представляет собой ферментер, куда с постоянной скоростью поступает питательная среда и из которого с такой же скоростью происходит отток культуры. Обычно питательная среда

содержит в избытке все компоненты за исключением какого-либо одного, например, источника азота, углерода, фосфора, магния, витаминов и т. п., который выполняет роль фактора, ограничивающего рост клеток (лимитирующий фактор). Хемостат при скорости потока (следовательно, и скорости роста) меньше μ_{\max} (максимальной скорости роста) представляет собой саморегулирующуюся систему. Эта система способна в течение продолжительного времени автоматически поддерживать постоянный уровень биомассы, скорость роста и концентрацию компонента среды, лимитирующего рост. Динамическое равновесие устанавливается при $\mu = D$.

Хемостатное культивирование дает возможность наблюдать особенности обмена веществ изучаемых микроорганизмов только в зависимости от скорости их роста или, напротив, сохраняя постоянную скорость роста клеток, изменять условия среды. Кроме того, этот метод позволяет долгое время поддерживать клетки в определенном физиологическом состоянии.

2.2. Турбидостатное культивирование

При турбидостатном выращивании в ферментере поддерживается постоянный уровень биомассы, который по оптической плотности культуры регистрируется специальным прибором, снабженным фотозлементом. Как только уровень биомассы поднимается выше заданного, сигнал фотозлемента приводит в действие насос, подающий питательную среду. Необходимый уровень жидкости в аппарате поддерживается при помощи специального сливного устройства. Таким образом, скорость накопления биомассы управляет скоростью притока питательной среды. Рост микроорганизмов в турбидостате осуществляется без внешнего лимитирования. При этом скорость роста приближается к μ_{\max} .

3. Оценка параметров роста периодической культуры

Результаты количественного изучения роста микробных популяций могут быть представлены более информативно и точно, если анализируются различные параметры роста: удельная скорость роста, время генерации (время удвоения биомассы), лаг-период, экономический коэффициент и т. д.

1. *Удельная скорость роста культуры* рассчитывается по данным концентрации биомассы в фазах активного роста культуры по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{T_1 - T_0} \quad (2)$$

где X_0 и X_1 – значения биомассы, соответствующие времени роста T_0 и T_1 .

Биомассу можно измерять весовым методом (г/л, мг/л), по данным нефелометрии оптической плотности (A) суспензии клеток микроорганизмов, в единицах A . Для характеристики микроорганизмов часто используют *максимальную удельную скорость роста* μ_{\max} – удельная скорость роста в экспоненциальной фазе.

2. *Время удвоения биомассы (время генерации)*. Каждая одиночная клетка бактерий при размножении образует 2 новые клетки, в благоприятных условиях среды обитания такие клетки будут размножаться в геометрической прогрессии, т. е. экспоненциально:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ или } g = \frac{0.693}{\mu} \quad (3)$$

где g – время генерации, μ – удельная скорость роста.

3. *Экономический коэффициент* (или выход биомассы от потребленного субстрата) определяется из уравнения:

$$Y = \frac{X}{S - S_0} \times 100\% \quad (4)$$

где X – концентрация биомассы, S – начальная концентрация субстрата в среде, S_0 – остаточная концентрация субстрата в культуральной жидкости.

4. Длительность лаг-периода (L) определяется графически.

Если на графике зависимости биомассы от времени (см. рис. 22) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, будет соответствовать L .

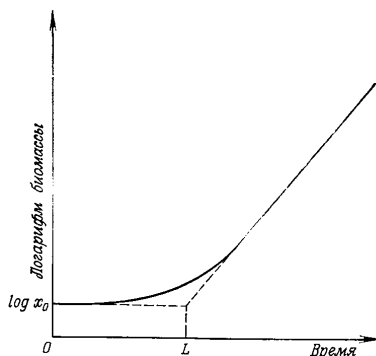


Рисунок 22. Фазы роста культуры микроорганизмов. Определение длительности лаг-периода.

4. Определение кинетических характеристик роста культур микроорганизмов для прогноза непрерывного культивирования

K_s , μ_{\max} , и Y являются важнейшими параметрами, характеризующими рост микроорганизмов в непрерывной и периодической культуре.

В настоящее время в промышленности для получения продуктов микробного синтеза используется метод непрерывного культивирования. Основным условием стабильного состояния

культуры в непрерывном процессе является равенство удельной скорости роста (μ) и скорости разбавления (D).

Скорость роста микроорганизмов определяется физиологическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого углеродного субстрата и его концентрацией в среде. Высокие исходные концентрации некоторых компонентов среды могут ингибировать рост микроорганизмов. Наиболее важной характеристикой роста микроорганизмов является их теоретическая максимальная удельная скорость роста (μ_{\max}). Она рассчитывается при выборе перспективных культур для получения биомассы или продуктов метаболизма микроорганизмов в условиях непрерывного культивирования. Чем выше μ_{\max} при росте на конкретном субстрате, тем устойчивее и продуктивнее будет идти процесс получения необходимого продукта. С практической удельной скоростью роста (μ) она связана математическим выражением Моно и имеет следующий вид:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (5)$$

где μ – практическая удельная скорость роста; S – концентрация лимитирующего фактора в среде; K_s – константа насыщения (константа Михаэлиса-Ментена), равная концентрации лимитирующего фактора, при котором $\mu_{\max} = 1/2$, величина K_s обратно пропорциональна *сродству организма к субстрату*. По своей форме уравнение Моно соответствует зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при химических реакциях (уравнение Михаэлиса-Ментена).

Величину K_s можно определить в опытах, где суспензией клеток засевают среды с различными, но очень низкими

концентрациями субстрата S . Через короткие интервалы времени (1, 2, 3 ч и далее) измеряют величину биомассы и вычисляют значение μ . Далее строят график зависимости μ от концентрации субстрата S (рис. 23). Проводят линию, параллельную оси абсцисс, на уровне самого высокого значения μ до пересечения с осью ординат. Количественное значение K_s рассчитывается графически экстраполированием величины $\frac{1}{2} \mu_{\max}$ на ось абсцисс (концентрация субстрата).

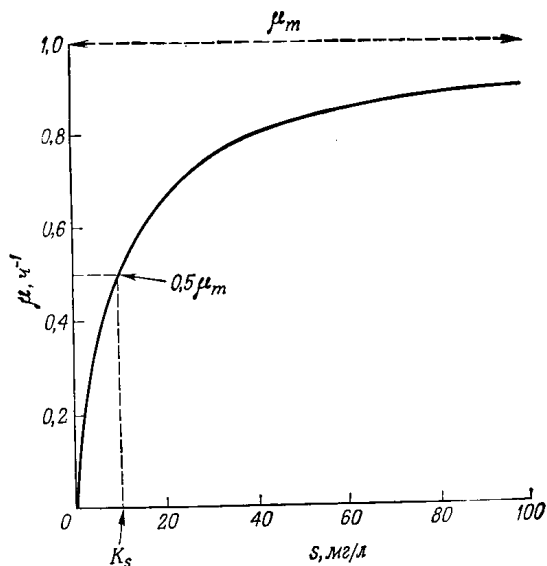


Рисунок 23. Зависимость удельной скорости роста культуры (μ) от концентрации субстрата (S) в соответствии с уравнением Моно. $K_s = 10 \text{ мг/л}$, при $S=K_s$, а $\mu=0,5 \mu_{\max}$

Преобразуя уравнение (5), получаем:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{S \mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (6)$$

т.е., построив график зависимости $1/\mu$ от $1/S$, получим прямую линию, которая пересекает ось абсцисс в точке $-1/K_s$, а ось ординат - в точке $1/\mu_{\max}$ (рис. 23). Линейность графика в случае, когда по оси ординат откладывают обратные величины, служит удобным методом для проверки гиперболической зависимости.

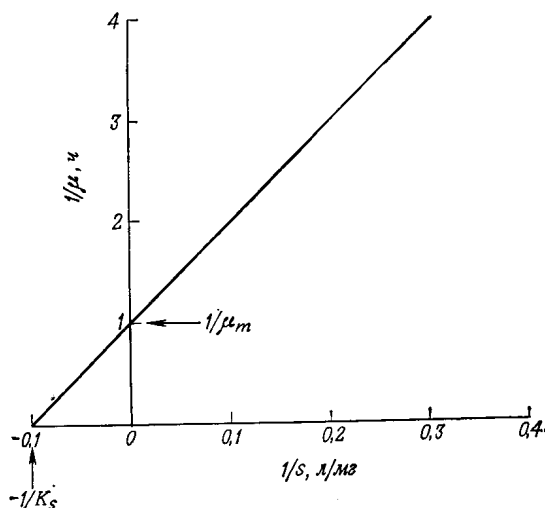


Рисунок 24. Данные рисунка 23 в обратных координатах

5. Графоаналитический метод расчета условий непрерывного культивирования

Принцип метода состоит в сопоставлении графиков зависимости накопления биомассы от времени культивирования (см. рис. 21) с кривой продуктивности по выходу биомассы dx/dt . Для этого в правой половине графика зависимости образования биомассы от времени культивирования (кривая X) наносят кривую зависимости продуктивности культуры по выходу биомассы от ее концентрации, т.

е. dX/dt от X в тех же единицах оптической плотности (ед. ОП) (кривая $\frac{dx}{dt}(x)$) (рис. 25).

Величина dX/dt рассчитывается по данным кривой роста.

Пример: $X_2 = 3$ ед. ОП; $X_1 = 1,5$ ед. ОП, $t_2 = 4,5$ ч $t_1 = 3,5$ ч тогда $dX/dt = 1,5$ ед. ОП/ч.

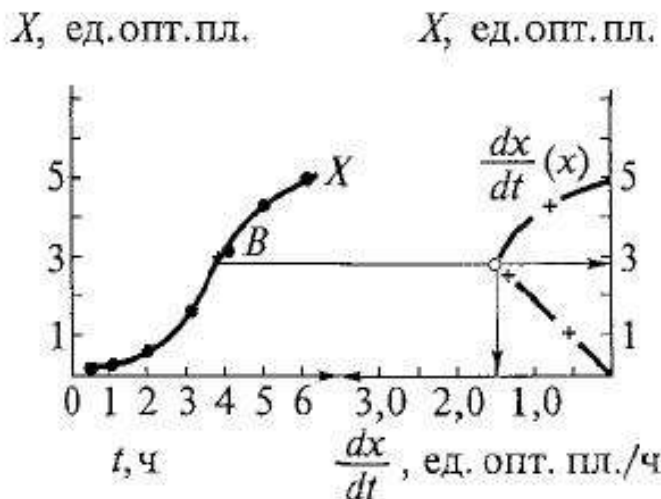


Рисунок 25. Кривая роста культуры (X) и кривая продуктивности по выходу биомассы $\frac{dx}{dt}(x)$.

На кривой зависимости продуктивности культуры находим точку, соответствующую максимальному значению dX/dt . При пересечении перпендикуляра с осью абсцисс находим точку, которая соответствует состоянию динамического равновесия при непрерывном

культивировании dX/dt (например, 1,5 ед. ОП/ч). Проведя параллель по найденной точке до пересечения с осью ординат, находим показатель оптической плотности, соответствующий определенной концентрации биомассы X (например, 3 ед. ОП). Продлив эту прямую до пересечения с кривой роста, находим фазу роста, в которой будет поддерживаться культура. Опустив перпендикуляр на ось абсцисс со шкалой времени культивирования, находим время, необходимое для выхода культуры в нужную фазу роста и начала проточного культивирования. В стационарных условиях скорость потока (D) равна удельной скорости роста (μ). Их рассчитываем по формуле:

$$D = \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{1,5 \text{ ед. ОП/ч}}{3 \text{ ед. ОП}} = 0,5 \text{ ч}^{-1}$$

Таким образом, находим, что если при оптической плотности культуры, равной 3 в ферментере включить проток со скоростью $0,5 \text{ ч}^{-1}$, то производительность процесса получения биомассы будет максимальна. Культивирование будет осуществляться в режиме турбидостата.

Задания

Задание 1. Получение кривой роста культуры микроорганизмов

1. Выбрать вариант культивирования

Примерные варианты культивирования микроорганизмов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Варианты культивирования микроорганизмов

№	Микроорганизм	Среда	Субстрат	Температура, °С	Режим аэрации,

					об/мин
1	<i>E.coli</i> K12	LB	-	28	180
2	<i>E.coli</i> K12	LB	-	37	180
3	<i>Pseudomonas putida</i> NF142	LB	-	28	180
4	<i>Arthrobacter sp.</i> BS2	LB	-	28	180
5	<i>Gluconobacter oxidans</i>	Среда G	сорбит	28	180
6	<i>Pichia sp.</i> 2518	Среда Y	Глюкоза (10 г/л)	28	180
7	<i>Pichia sp.</i> 2518	Среда Y	Глицерин (10 г/л)	28	180

Среды для культивирования

LB (Лурия – Бертрани): триптон - 10г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 10 г/л. Довести pH до 7,5.

Среда Y: (NH₄)₂SO₄ - 2,5 г/л, MgSO₄ - 0,2 г/л, K₂HPO₄х 3 H₂O - 0,7 г/л, NaH₂PO₄х 3 H₂O - 3 г/л, дрожжевой экстракт - 0,5 г/л, DL-лейцин - 0,17 г/л, глицерин – 8,3 мл/л (или глюкоза 10 гл), микроэлементы (ЭДТА-10г/л, ZnSO₄х 7H₂O - 4.4 г/л, MnCl₂ х 4H₂O - 1,01 г/л, CoCl₂ х 6H₂O - 0,32 г/л, CuSO₄ х 5H₂O - 0,315г/л, (NH₄)₆Мо₇O₂₄ х 4H₂O - 0,22г, CaCl₂ х 2H₂O - 1,47 г/л, FeSO₄ х 7H₂O - 1 г/л) - 1 мл.

Среда G: D-сорбит - 200 г/л; Дрожжевой экстракт - 20 г/л; Дистиллированная вода - 100 мл; pH среды - 5,2-5,5

Для приготовления агаризованных сред к жидким средам добавить агара из расчета 16-20 г/л

2. Приготовить питательную среду для выращивания бактерий:

- приготовить среды согласно прописи;
- среду разлить в 3 ферментационные колбы по 100 мл;
- колбы плотно закрыть ватно-марлевыми пробками и стерилизовать автоклавированием 30 мин при 121°C;
- после автоклавирования колбы подписать (отметить микроорганизм, который будете засевать, дату, фамилию и номер колбы);

3. Засев инокулята:

- Засеять одну колбу для инокулята культурой и инкубировать (культивировать) в течение суток при заданных условиях;

- На следующий день засеять одну из колб, добавив 5-10 мл инокулята (инокулят хранить в холодильнике до засева второй колбы);

- Измерить исходную оптическую плотность культуры, для чего отобрать 2,5 мл культуры в отдельную пробирку и измерить оптическую плотность на спектрофотометре относительно воды при длине волны 590 нм;

- Вторую колбу засеять через 8 часов, добавив 5-10 мл того же инокулята, который добавляли в первую колбу;

4. Колбы установить на качалку с заданными параметрами температуры и аэрации.

5. Периодически (через 1-2 часа) производить отбор проб для измерения оптической плотности культуры.

6. Данные занести в табл. 5.

Таблица 5. Показатели роста культуры в ходе периодического культивирования

Дата	Время	Время от начала засева (колба 1), ч	Оптическая плотность A_1 , ед. (колба1)	Время от начала засева (колба 2), ч	Оптическая плотность A_2 , ед. (колба2)

7. По результатам эксперимента построить кривые роста культур бактерий (оптическая плотность от времени культивирования и \ln оптической плотности от времени), объединив значение полученные для первой и для второй колбы (время берут из таблицы 1 - время от начала засева по колбе 1 и 2).

8. Рассчитать параметры роста данной периодической культуры:

- а) длительность фаз (по графику);
 - б) максимальную удельную скорость роста;
 - в) время генерации в экспоненциальной фазе роста;
9. Сделать вывод по работе.

Задание 2. Определение КОЕ

- приготовление материала

1. Приготовить 200 мл агаризованной питательной среды для выращивания бактерий.
2. Приготовить физ. раствор и разлить по 14 пробиркам по 4,5 мл.
3. Упаковать 6 чашек Петри.
4. Агаризованную среду, пробирки с физ. раствором и чашки Петри стерилизовать автоклавированием 30 мин при 121°C;

-отбор проб и высев

1. После засева колб отобрать 0,5 мл и добавить в одну из пробирок с 4,5 мл физ. раствора;
2. Приготовить 7 десятикратных разведений культуры;
3. Залить чашки Петри агаризованной средой и подсушить под УФ;
4. Сделать высев по 0,1 мл из соответствующих разведений;
5. Чашки Петри поместить в термостат крышками вниз для инкубации при температуре 28°C на 24 – 48 часов;
6. После завершения снятия кривой роста отобрать 0,5 мл культуральной жидкости, добавить в одну из пробирок с 4,5 мл физ. раствора и повторить п. 2-5.
7. Через 1-2 дня подсчитать число выросших на чашках Петри колоний и рассчитать содержание микроорганизмов (КОЕ/мл) в культуре на момент отбора проб:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

где М – количество клеток в 1 мл;

а – число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

n – коэффициент разведения.

8. Сделать вывод по работе.

Задание 3. Построение кривой роста и расчет параметров роста по известным данным

1. Построить кривую роста культуры по показателям оптической плотности (табл. 5).

2. Рассчитать параметры роста данной периодической культуры:

- а) длительность лаг-фазы (по графику);
- б) максимальную удельную скорость роста;
- в) время генерации в экспоненциальной фазе роста;

3. Используя данные табл. 6, рассчитать экономический коэффициент (выход биомассы от потребленного субстрата) для данной культуры.

Задание 4. Расчет параметров для непрерывного культивирования

1. Построить график зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата для данной культуры на основании данных табл. 7.

2. Рассчитать значение теоретической μ_{\max} по формуле (5) при максимальном значении S (табл. 7).

3. По данным графика построенным в обратных координатах ($1/\mu$ от $1/S$) определить:

- а) значение константы Михаэлиса-Ментена (K_s);
- в) значение практической максимальной скорости роста (μ_{\max}).

4. Графоаналитическим методом рассчитать скорость потока для максимальной продуктивности культуры по выходу биомассы в единицах ОП (в режиме турбидостата), время культивирования в стационарных условиях и подключения подачи питательной среды (по вариантам 1-го этапа).

Контрольные вопросы

1. Какие два основных способа культивирования выделяют в зависимости от способа подачи питательных веществ и отбора получаемых продуктов?

2. Что называют периодическим культивированием? Чем характеризуется данный способ культивирования?
3. Что называют инокулятом?
4. Чем описывается рост микроорганизмов в периодическом режиме культивирования?
5. Какие фазы роста выделяют при периодическом культивировании микроорганизмов? Дайте характеристику каждой фазе роста.
6. Что называют непрерывным культивированием?
7. Как называют аппарат для непрерывного культивирования микроорганизмов?
8. Что характеризует скорость разбавления? Как рассчитать скорость разбавления?
9. Какие способы непрерывного культивирования выделяют в зависимости от контроля и управления процессами? Дайте характеристику этим способам?
10. Какие основные параметры роста периодической культуры анализируют? Как рассчитать эти параметры?
11. Какие параметры роста являются важными при непрерывном культивировании микроорганизмов?
12. Что характеризует величина K_s ? Как ее определяют?
13. В чем заключается графоаналитический метод расчета условий непрерывного культивирования?

Таблица 5. Зависимость биомассы (X), единицы оптической плотности (ОП) от времени культивирования (Т) на углеродном субстрате

№	Культура	Субстрат	Время культивирования, ч											
			0	2	4	6	10	20	30	40	50	60	70	80
			Показания оптической плотности											
1	<i>Candida utilis</i>	глюкоза	0,1	0,105	0,11	0,12	0,15	0,33	0,5	0,6	0,62	0,63	0,64	0,64
2	<i>Rhococcus sp.</i>	фенол	0,07	0,072	0,075	0,079	0,09	0,13	0,18	0,25	0,3	0,33	0,34	0,35
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	метанол	0,085	0,087	0,09	0,096	0,12	0,19	0,27	0,34	0,39	0,42	0,43	0,44
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	сахароза	0,1	0,102	0,105	0,109	0,12	0,17	0,23	0,31	0,38	0,44	0,47	0,48
5	<i>Methylococcus sp.</i>	пропионат	0,051	0,052	0,053	0,055	0,06	0,08	0,12	0,2	0,3	0,38	0,44	0,44
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	маннит	0,05	0,053	0,058	0,066	0,087	0,15	0,22	0,285	0,34	0,36	0,36	0,36
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	ацетат	0,05	0,053	0,064	0,078	0,112	0,2	0,31	0,43	0,49	0,5	0,5	0,5
8	<i>Bacillus turing</i>	глюкоза	0,05	0,05	0,06	0,1	0,2	0,5	0,73	0,81	0,86	0,88	0,88	0,88
9	<i>Candida scotti</i>	мальтоза	0,07	0,07	0,08	0,1	0,15	0,29	0,5	0,75	0,88	0,9	0,9	0,9
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	каприловая кислота	0,06	0,061	0,065	0,072	0,095	0,16	0,24	0,28	0,31	0,33	0,33	0,33
11	<i>Brevibacterium sp.</i>	нафталин	0,03	0,032	0,035	0,039	0,048	0,1	0,17	0,3	0,45	0,5	0,53	0,55
12	<i>Arthrobacter sp.</i>	нафталин	0,06	0,06	0,062	0,064	0,069	0,083	0,098	0,15	0,34	0,52	0,57	0,57
13	<i>Metilobacter sp.</i>	метанол	0,02	0,02	0,023	0,031	0,05	0,16	0,3	0,46	0,58	0,65	0,68	0,7
14	<i>Pseudomonas putida</i>	капролакт ам	0,05	0,06	0,073	0,095	0,15	0,33	0,52	0,65	0,7	0,73	0,74	0,75
15	<i>Pseudomonas</i>	нафталин	0,103	0,104	0,106	0,11	0,13	0,21	0,35	0,52	0,62	0,68	0,7	0,7

	<i>putida</i>													
16	<i>Pichia angusta</i>	глицерин	0,115	0,117	0,119	0,12	0,123	0,135	0,15	0,19	0,36	0,55	0,57	0,58
17	<i>Pichia angusta</i>	этанол	0,06	0,06	0,07	0,082	0,13	0,3	0,51	0,63	0,73	0,76	0,79	0,8
18	<i>Gluconobacter oxidans</i>	сорбит	0,017	0,019	0,025	0,029	0,04	0,08	0,15	0,28	0,5	0,8	0,88	0,9
19	<i>Azotobacter sp.</i>	Глюкоза + кадмий	0,018	0,018	0,018	0,019	0,025	0,04	0,06	0,13	0,27	0,4	0,42	0,42
20	<i>Arthrobacter sp.</i>	глюкоза + кадмий	0,02	0,02	0,02	0,023	0,06	0,19	0,31	0,4	0,42	0,44	0,45	
21	<i>Eschericia coli</i>	глюкоза	0,03	0,03	0,03	0,033	0,05	0,1	0,18	0,33	0,45	0,5	0,5	0,5
22	<i>Pseudomonas sp.</i>	капролакт ам	0,05	0,05	0,05	0,052	0,055	0,068	0,095	0,18	0,35	0,45	0,48	0,48
23	<i>Brevibacterium sp.</i>	нафталин	0,11	0,11	0,114	0,12	0,135	0,2	0,3	0,45	0,7	0,9	0,95	0,95
24	<i>Arthrobacter sp.</i>	нафталин	0,08	0,082	0,084	0,087	0,096	0,124	0,25	0,65	0,87	0,9	0,92	0,94
25	<i>Arthrobacter sp.</i>	Нафталин + 5%NaCl	0,014	0,015	0,018	0,026	0,045	0,13	0,24	0,41	0,57	0,7	0,75	0,77
26	<i>Eschericia coli</i>	маннит	0,008	0,01	0,01	0,012	0,02	0,06	0,21	0,52	0,7	0,84	0,85	0,85
27	<i>Candida sp.</i>	глицерин	0,108	0,11	0,112	0,12	0,15	0,25	0,4	0,7	0,95	1,18	1,2	1,2

Таблица 6. Выход биомассы, начальная концентрация субстрата в среде и остаточные концентрации в культуральной жидкости

№	Культура	Субстрат	Биомасса, ед. ОП (X)	Начальная концентрация субстрата в среде, мг/л (S)	Остаточная концентрация субстрата культуральной жидкости, мг/л (S ₀)
1	<i>Candida utilis</i>	Глюкоза	500	1000	100
2	<i>Rhococcus sp.</i>	Фенол	200	500	50
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	Метанол	100	250	20
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	Сахароза	500	2000	1000
5	<i>Methylococcu ssp.</i>	Пропионат	300	2000	900
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	Маннит	550	1000	150
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Ацетат	480	2000	800
8	<i>Bacillus turing</i>	Глюкоза	540	1000	80
9	<i>Candida scotti</i>	Мальтоза	400	1000	100
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	Каприловая кислота	200	1000	500
11	<i>Brevibacterium sp.</i>	Нафталин	500	1000	100
12	<i>Arthrobacter sp.</i>	Нафталин	450	1000	100
13	<i>Metilobacte rsp.</i>	Метанол	200	500	30
14	<i>Pseudomonas putida</i>	Капролактам	500	2000	20

15	<i>Pseudomonas putida</i>	Нафталин	350	1000	100
16	<i>Pichia angusta</i>	Глицерин	500	1500	50
17	<i>Pichia angusta</i>	Этанол	450	1000	80
18	<i>Gluconobacter oxidans</i>	Сорбит	350	1000	120
19	<i>Azotobacter sp.</i>	Глюкоза+кадмий	200	1000	200
20	<i>Arthrobacter sp.</i>	Глюкоза + кадмий	100	1000	250
21	<i>Eschericia coli</i>	Глюкоза	300	1000	20
22	<i>Pseudomonas sp.</i>	Капролактам	300	1000	50
23	<i>Brevibacterium sp.</i>	Нафталин	540	1000	100
24	<i>Arthrobacter sp.</i>	Нафталин	400	1000	120
25	<i>Arthrobacter sp.</i>	Нафталин+5%NaCl	200	1000	200
26	<i>Eschericia coli</i>	Маннит	500	2000	300
27	<i>Candida sp.</i>	Глицерин	450	1500	100

Таблица 7. Зависимость удельной скорости роста культур (μ) от концентрации субстрата (S)

№	Культура	Субстрат	параметры							
1	<i>Candida utilis</i>	глюкоза	S мг/л	20	40	80	120	160	200	300
			μ ч ⁻¹	0,2	0,3	0,4	0,43	0,46	0,47	0,47
2	<i>Rhococcus sp.</i>	фенол	S мг/л	100	140	160	240	600	800	1000
			μ ч ⁻¹	0,07	0,09	0,1	0,13	0,19	0,2	0,2
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	метанол	S мг/л	10	20	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,3	0,5	0,6	0,75	0,82	0,85	0,9
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	сахароза	S мг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,06	0,1	0,12	0,15	0,18	0,19	0,2
5	<i>Methylococcus sp.</i>	пропионат	S мг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,04	0,08	0,12	0,15	0,2	0,23	0,24
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	маннит	S мг/л	20	40	60	80	100	120	140
			μ ч ⁻¹	0,05	0,1	0,15	0,2	0,23	0,24	0,25
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	ацетат	S мг/л	10	20	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,13
8	<i>Bacillus turing</i>	глюкоза	S мг/л	20	40	60	80	100	120	140
			μ ч ⁻¹	0,05	0,08	0,1	0,11	0,115	0,12	0,12

9	<i>Candida scotti</i>	мальтоза	S мг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,05	0,07	0,09	0,1	0,11	0,12	0,12
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	каприловая кислота	S мг/л	10	20	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,04	0,07	0,1	0,13	0,16	0,18	0,19
11	<i>Brevibacterium sp.</i>	нафталин	S мг/л	20	35	45	55	70	85	100
			μ ч ⁻¹	0,15	0,25	0,3	0,35	0,39	0,42	0,45
12	<i>Arthrobacter sp.</i>	нафталин	S мг/л	10	20	35	50	65	75	90
			μ ч ⁻¹	0,04	0,07	0,1	0,12	0,13	0,13	0,13
13	<i>Metilobacter sp.</i>	метанол	S мг/л	20	80	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,02	0,08	0,14	0,18	0,21	0,24	0,25
14	<i>Pseudomonas putida</i>	капролакта м	S мг/л	5	15	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,06	0,15	0,23	0,26	0,28	0,29	0,3
15	<i>Pseudomonas putida</i>	нафталин	S мг/л	10	25	60	80	100	120	140
			μ ч ⁻¹	0,1	0,22	0,4	0,45	0,48	0,49	0,5
16	<i>Pichia angusta</i>	глицерин	S мг/л	25	50	75	100	125	150	175
			μ ч ⁻¹	0,03	0,05	0,07	0,09	0,1	0,105	0,11
17	<i>Pichia angusta</i>	этанол	S мг/л	30	110	190	260	340	420	500
			μ ч ⁻¹	0,03	0,11	0,17	0,21	0,23	0,24	0,25

18	<i>Gluconobacter oxidans</i>	сорбит	S мг/л	20	65	115	160	205	250	300
			μ ч ⁻¹	0,1	0,23	0,31	0,38	0,42	0,44	0,45
19	<i>Azotobacter</i> sp.	глюкоза + кадмий	S мг/л	20	50	80	110	140	170	200
			μ ч ⁻¹	0,04	0,08	0,1	0,115	0,12	0,126	0,13
20	<i>Arthrobacter</i> sp.	глюкоза + кадмий	S мг/л	10	20	35	50	65	75	90
			μ ч ⁻¹	0,05	0,1	0,17	0,2	0,23	0,24	0,25
21	<i>Eschericia coli</i>	глюкоза	S мг/л	10	20	35	45	55	65	80
			μ ч ⁻¹	0,08	0,16	0,28	0,35	0,38	0,42	0,43
22	<i>Pseudomonas</i> sp.	капролакта м	S мг/л	20	50	75	125	150	175	200
			μ ч ⁻¹	0,2	0,42	0,56	0,64	0,67	0,68	0,7
23	<i>Brevibacterium</i> sp.	нафталин	S мг/л	10	30	60	85	105	125	150
			μ ч ⁻¹	0,12	0,3	0,49	0,56	0,57	0,59	0,6
24	<i>Arthrobacte</i> rsp.	нафталин	S мг/л	20	65	115	160	205	250	300
			μ ч ⁻¹	0,02	0,05	0,08	0,09	0,1	0,11	0,11
25	<i>Arthrobacte</i> rsp.	нафталин + 5%NaCl	S мг/л	20	65	115	160	205	250	300
			μ ч ⁻¹	0,02	0,054	0,1	0,12	0,13	0,14	0,14
26	<i>Eschericia coli</i>	маннит	S мг/л	50	125	200	275	350	425	500
			μ ч ⁻¹	0,05	0,11	0,14	0,17	0,18	0,19	0,2
27	<i>Candida</i> sp.	глицерин	S мг/л	30	100	170	240	310	380	450
			μ ч ⁻¹	0,07	0,16	0,22	0,27	0,31	0,33	0,34

РАЗДЕЛ 5: МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторная работа № 13

Методы количественного учета микроорганизмов.

Определение количества клеток микроорганизмов высеvom на плотные питательные среды (метод Коха)

Цель работы: определить количество клеток микроорганизмов исследуемой культуры высеvom на агаризованную среду LB, используя метод стандартных серийных разведений.

Материалы и оборудование: чашки Петри с плотной питательной средой LB, шпатель Дригальского, стерильные пробирки с физиологическим раствором, автоматическая пипетка с наконечниками, исследуемые культуры бактерий в жидкой питательной среде, спиртовки.

Основные положения

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или в питательных средах судят по изменению количества их клеток или биомассы в единице объема. Методы определения этих показателей бывают:

- *прямые* (подсчет клеток под микроскопом и взвешивание биомассы);

- *косвенные* (основаны на измерении параметров, величина которых зависит от количества биомассы микроорганизмов - число

выросших колоний, поглощение суспензией света, содержание белка и т.д.).

Определение числа клеток микроорганизмов высевом на плотные питательные среды (ПС) – является косвенным методом. В отличие от подсчета клеток под микроскопом, он дает возможность определить только число жизнеспособных клеток в популяции. Сред, пригодных для роста всех микроорганизмов не существует, поэтому метод посева дает возможность определить лишь число микроорганизмов, способных расти на среде данного состава.

Метод применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную ПС определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток. Результаты количественного метода выражают не в числе клеток, а в условных единицах – колониобразующих единицах (КОЕ).

Определение числа клеток этим методом состоит из 3-х этапов:

- приготовление разведений;
- посев на плотную питательную среду;
- подсчет колоний.

1. Приготовление разведений

Численность популяции микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в

стерильной водопроводной воде или физиологическом растворе. Целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, например 10. Для приготовления разведений физ. раствор разливают по 4,5 мл в стерильные пробирки. Затем 0,5 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой вносят в первую пробирку – это первое разведение (10^{-1}). Полученное разведение тщательно перемешивают и новой стерильной пипеткой отбирают 0,5 мл суспензии и переносят во вторую пробирку – второе разведение (10^{-2}). Аналогично готовят все последующие разведения (рис.26). Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов.

2. Посев

Посев поверхностным способом осуществляют в чашки Петри с агаризованной ПС. Для этого в чашку вносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы, как правило, проводят из трех последних разведений, причем из каждого делают 2-4 параллельных высева. После посева чашки помещают в термостат крышками вниз.

При глубинном посеве точно измеренный объем исходной суспензии или разведения вносят в расплавленную и остуженную до 45-50 °С среду, тщательно перемешивают и немедленно выливают в чашку Петри.

Для определения количества клеток анаэробов чашки после посева помещают в анаэрогат.

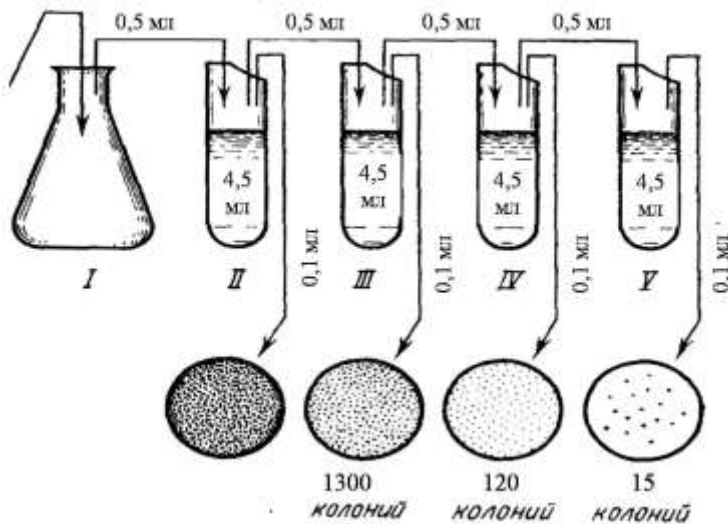


Рисунок 26. Приготовление разведений

3. Подсчет выросших колоний

Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 1-15 суток инкубации. Подсчет проводят не открывая чашки, а для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. Лучшим разведением считается то, из которого при высева вырастает от 30 до 150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то результаты не используют. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

где М – количество клеток в 1 мл (КОЕ/мл);

а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

10^n – коэффициент разведения (n- номер десятикратного разведения).

Задания

1. Разогреть и разлить стерильную питательную агаризованную среду LB в чашки Петри.
2. Методом стандартных серийных разведений приготовить серию разведений (6 пробирок) исследуемой суспензии бактерий.
3. Из 5-го и 6-го разведений сделать высев в двух повторностях на чашки Петри со средой LB.
4. Чашки Петри поместить в термостат крышками вниз для инкубации при температуре 28 и 37°C на 24 – 48 часов.
5. Произвести подсчет числа колоний и вычислить количество КОЕ в 1 мл исходной суспензии.
6. Результаты опыта занести в таблицу 8.
7. Сделать вывод по работе.

Таблица 8 – Результаты опыта определения КОЕ высевам на плотные питательные среды

Название культуры	Разведение	Число выросших колоний		Среднее число колоний, а	КОЕ, М
		1 чашка	2 чашка		
<i>Escherichia coli</i>	10^5				
	10^6				
<i>Pseudomonas putida</i>	10^5				
	10^6				

Контрольные вопросы

1. По каким показателям судят о росте микроорганизмов в естественных субстратах или в питательных средах? Какие методы определения этих показателей бывают?
2. Почему метод определения числа клеток микроорганизмов высевом на плотные питательные среды является косвенным методом?
3. В чем заключается принцип Коха?
4. Какие этапы выделяют при определении числа клеток микроорганизмов высевом на плотные питательные среды?
5. Как рассчитать количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата по методу Коха?

Лабораторная работа № 14

Методы количественного учета микроорганизмов. Определение количества клеток микроорганизмов под микроскопом

Цель работы: определить количество клеток микроорганизмов исследуемой культуры под микроскопом, используя камеру Горяева-Тома.

Материалы и оборудование: автоматическая пипетка с наконечниками, исследуемые культуры микроорганизмов (дрожжи) в жидкой питательной среде, спиртовки, микроскоп, камера Горяева-Тома.

Основные положения

Для подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом используют счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток. Эти методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема (как живых, так и мертвых).

Подсчет клеток в счетных камерах.

Метод используют для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов и крупных бактерий. Для этого используют камеру Горяева-Тома: толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка (рис.27).

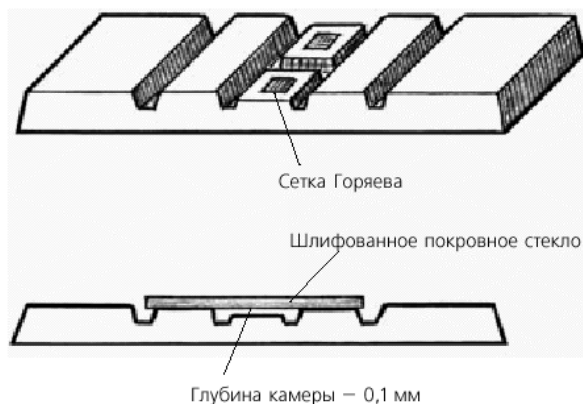


Рисунок 27. Камера Горяева-Тома

Камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов, которую вносят капилляром или пипеткой. Углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом, и слегка прижимая, двигают покровное стекло в противоположные стороны.

Камеру помещают на столик микроскопа. Число клеток подсчитывают с объективом $8\times$ ($10\times$, $40\times$). С иммерсионным объективом работать нельзя, т.к. его рабочее расстояние меньше толщины стекла камеры. Просчитывают клетки микробов в 10 больших или 16 малых квадратах, следуя по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата (рис.28). Подсчет клеток повторяют 3-5 раз, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее суспензией микроорганизмов, что обеспечивает точность подсчета.

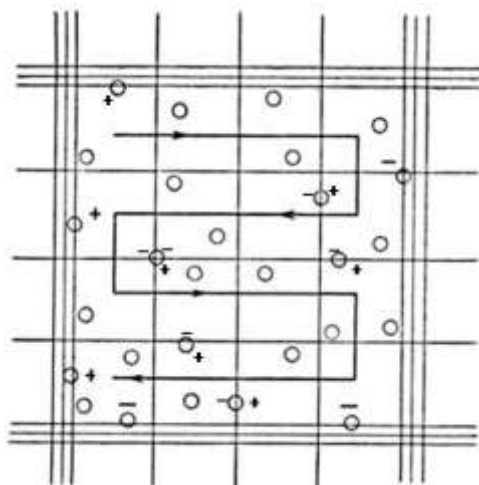


Рисунок 28. Большой квадрат сетки Горяева (ограничен тремя линиями) состоит из 16 малых квадратов. Плюсом обозначены клетки, которые считают, минусом клетки, которые не учитывают при подсчете. Стрелками указано направление подсчета.

Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

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

где М – количество клеток в 1 мл суспензии (клеток/мл);

а – среднее количество клеток в квадрате;

h – высота камеры, мм (0,1 мм);

S – площадь квадрата сетки, мм²;

10³ - коэффициент перевода (см³ в мм³);

n – коэффициент разведения исследуемой культуры (во сколько раз разбавили исследуемую культуру).

Размер малых делений клетки сетки составляют 0,05 мм, а больших – 0,2 мм.

Количество клеток в 1 мл не разбавленной культуры (клеток/мл):

$$M = \frac{a \times 10^3}{0,1 \times 0,04} = a \times 25 \times 10^4$$

Задания

1. Изучить устройство камеры Горяева.
2. Найти под микроскопом малые и большие квадраты.
3. Подсчитать количество клеток в 1 мл исследуемой культуры, используя камеру.
4. Сделать вывод по работе

Контрольные вопросы

1. Как устроена камера Горяева-Тома?

2. Преимущества и недостатки счетных камер.
3. Как правильно подсчитывать клетки с помощью камеры Горяева-Тома?
4. Что учитывают при выражении количества клеток в 1мл исследуемой суспензии культуры?

Литература

1. Белясова, Н.А. Микробиология [Электронный ресурс]: учебник/ Белясова Н.А.— Электрон. текстовые данные.— Минск: Вышэйшая школа, 2012.— 443 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/20229>.— ЭБС «IPRbooks», по паролю
2. Березовская В.А., Белоусова И.Н., Ключкова Н.Г. Биология и микробиология: Учебно-методическое пособие (практикум). – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2006. – 92 с.
3. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник для вузов/ Н.С.Егоров; МГУ им. М. В. Ломоносова.-6-е изд., перераб. и доп.- М.: Изд-во Моск.ун-та: Наука, 2004.-528с
4. Емцев, В.Т. Микробиология: учебник для вузов/ В.Т.Емцев, Е.Н.Мишустин.-6-е изд.,испр.- М.: Дрофа, 2006.- 444с.
5. Зимоглядова Т. В. И др. Практикум по микробиологии : учебное пособие / Т. В. Зимоглядова, И. А. Карташева, О. Г. Шабалдас. – М. : Колос; Ставрополь : АГРУС, 2007 – 148с.
6. Лебедев, В.Н. Микробиология с основами вирусологии. Часть I. Основы общей вирусологии [Электронный ресурс]: методическое пособие для студентов биологических специальностей/ Лебедев В.Н.— Электрон. текстовые данные.— СПб.: Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 2014.— 62 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/22556>.— ЭБС «IPRbooks», по паролю
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник для высш. проф. образования : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко .— М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010

8. Методы общей и специальной микробиологии: Учебное пособие. /Е.В.Никитина, О.А. Решетник; Казан. гос. технол. ун-т. Казань, 2006, 124 с.
9. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования : методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» / сост. Л. А. Гаретова, О. А. Кириенко. – Хабаровск : Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. – 16 с.
10. Петр С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Петр. – М. : Издательство «Мир», 1978. - 330 с.
11. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: Учебник для мед.вузов/ О.К.Поздеев; под ред. В.И.Покровского.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.-768с.
12. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов/ А.И.Нетрусов [и др.]; под ред. А.И.Нетрусова. -М.: Академия, 2005.-608с.
13. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов/ Е.З.Теппер, В.К.Шильникова, Г.И.Переверзева; Под ред.В.К. Шильниковой.-5-е изд., перераб.и доп. -М.: Дрофа, 2004.-256с.

Учебное издание

Составители: Чепурнова М.А.

Акатова Е.В.

Нечаева И.А.

**Методические указания по выполнению
лабораторных работ по дисциплинам
«Микробиология с основами вирусологии» и
«Микробиология»**

Часть 1

Авторское редактирование

Изд.лиц.№0203300 от 12.02.1997. Подписано в печать 24.02.2016

Формат бумаги 60х84 1/16. Бумага офсетная.

Усл. печ.л. 7,0. Уч.-изд. л. 6,0.

Тираж 100 экз. Заказ 038

Тульский государственный университет

300012, г. Тула, просп. Ленина, 92

Отпечатано в Издательстве ТулГУ

300012, г. Тула, просп. Ленина, 95