

Саратовский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского

МИКРОБИОЛОГИЯ. БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ

Учебное пособие
для студентов биологического факультета

Саратов, 2015

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Р85

Авторы: А.М. Петерсон, Е.В. Глинская, О.Ю. Ксенофонтова,
Н.Ф. Шуршалова, Е.И. Тихомирова

Микробиология. Большой практикум: Учеб. пособие для студ. биол. фак. / Авторы: А. М. Петерсон, Е. В. Глинская, О. Ю. Ксенофонтова, Н. Ф. Шуршалова, Тихомирова Е.И. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2015. – 85 с.
ISBN 978-5-292-03880-1

Пособие охватывает широкий круг вопросов по выделению и изучению сапрофитных микроорганизмов из объектов окружающей среды, а также некоторые аспекты прикладной микробиологии. Представленные в практикуме задачи направлены на изучение микробной обсемененности различных объектов внешней среды, антимикробного действия химических и биологических агентов, микробиологических основ некоторых биотехнологических процессов, механизма переживания бактериями неблагоприятных условий среды, основных принципов санитарно-микробиологической оценки качества некоторых пищевых продуктов.

Для студентов биологического факультета, специализирующихся в области микробиологии.

Рекомендуют к печати:

кафедра микробиологии и физиологии растений
(Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского)

Доктор биологических наук С.А. Коннова
(Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского)

Печатается по решению Ученого совета
биологического факультета Саратовского государственного университета
имени Н.Г. Чернышевского

ВВЕДЕНИЕ

Пособие предназначено для студентов-биологов, обучающихся по специальности «Микробиология». Данное издание включает в себя теоретический и методологический материал, а также основанный на практическом опыте, накопленном сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Помимо теоретических знаний, будущим специалистам-микробиологам необходимы лабораторно-практические навыки, которые приобретаются на занятиях большого практикума по микробиологии. Каждая лабораторная работа данного пособия содержит краткое обоснование цели исследования, описание техники и методики постановки опыта, анализа полученных результатов, перечень необходимых материалов и оборудования для проведения экспериментов, а также контрольные вопросы. В конце каждой работы приводится список литературы, которая поможет студентам лучше понять механизмы и закономерности наблюдаемых микробиологических процессов. Предлагаемая форма заданий позволит студентам не только приобрести необходимые практические навыки, но и осмысленно подойти к их выполнению, самостоятельно организовывать эксперименты и интерпретировать их результаты. Каждая задача руководства является, по сути, небольшой научно-исследовательской работой, в процессе выполнения которой у студентов формируются навыки самостоятельного научного поиска.

Пособие охватывает широкий круг вопросов по выделению и изучению сапрофитных микроорганизмов из объектов окружающей среды и макроорганизмов, а также некоторые аспекты прикладной микробиологии. Представленные задачи направлены на изучение микробной обсемененности различных объектов внешней среды, антимикробного действия химических и биологических агентов, микробиологических основ некоторых биотехнологических процессов, механизма переживания бактериями неблагоприятных условий среды, основных принципов санитарно-микробиологической оценки качества некоторых пищевых продуктов.

Предлагаемое практическое руководство может быть полезно также студентам-биологам, обучающимся в смежных областях, специалистам сельскохозяйственных и биотехнологических факультетов и всем, кого интересуют проблемы микробиологии.

ЗАДАЧА 1

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Любые субстраты природного или антропогенного происхождения являются средой обитания для разнообразных микроорганизмов. О степени бактериальной обсеменённости того или иного субстрата судят по количеству клеток в единице объёма. Выбор метода для количественного учёта зависит от цели исследования, свойств субстрата, а также от особенностей физиологии и морфологии выделяемых микроорганизмов.

Число клеток в единице объёма можно определить непосредственным подсчётом их под микроскопом, либо косвенно, путём учёта роста микроорганизмов на питательных средах после предварительного посева определённого объёма исследуемого субстрата.

Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно используя счётные камеры (Горяева и др.), капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стёклах (метод Брида) или мембранных фильтрах. Данные методы позволяют учитывать общее количество клеток, как живых, так и мёртвых. Однако они применимы только для подсчёта относительно крупных клеток (дрожжей, крупных бактерий) в обильно обсеменённых субстратах.

Определение количества клеток методом посева на плотные питательные среды (метод Коха) позволяет выявить только число жизнеспособных клеток в популяции. Поскольку сред, одинаково пригодных для роста различных микроорганизмов, не существует, этот метод даёт возможность определить лишь число клеток микроорганизмов, способных расти на среде данного состава. Как правило, для определения микробной обсеменённости объекта используется среда ГРМ-агар, на которой определяется показатель КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Процесс идентификации – наиболее ответственная часть любого бактериологического исследования. В последние годы в микробиологическую практику внедряются генетические методы идентификации бактерий, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК или РНК микроорганизмов. Широкое применение нашли методы ДНК-ДНК-гибридизации, ДНК-зондов, анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Достаточно достоверными считаются серологические методы диагностики, основанные на изучении антигенных свойств бактерий. Их проводят с помощью специальных диагностических сывороток, содержащих антитела к определенным видам и сероварам бактерий. В некоторых случаях для дифференцирования бактерий внутри вида или серогруппы используется фаготипирование, основанное на применении специфических бактериофагов.

Однако существенным недостатком всех указанных методов является то, что они не дают представления о разнообразных функциях и биологических свойствах изучаемого штамма. Кроме того, данные методы разработаны в

основном для изучения микроорганизмов, имеющих медико-ветеринарное или санитарное значение, и пока не могут быть широко реализованы при идентификации огромного биоразнообразия сапрофитных бактерий, регулярно выделяющихся из различных объектов окружающей среды. Поэтому фенотипическая или функциональная система идентификации сохраняет свое значение для практических микробиологов. Она заключается в получении достоверных данных о всех свойствах (культуральных, морфологических, физиолого-биохимических и др.) микроорганизма и сравнении их с признаками, приведенными в определительных таблицах: «Определитель бактерий Берджи» (1997); «Определитель зоопатогенных микроорганизмов» (Сидоров и др., 1995); «Санитарно-значимые микроорганизмы» (Пивоваров, Королик, 2000).

Цель работы: выявить бактериальную обсеменённость исследуемого объекта (продукт питания), наличие в нём условно-патогенных бактерий (*E. coli*, *Staphylococcus* и др.), идентифицировать доминирующие виды.

Оборудование:

Посуда: ступка с пестиком, пробирки, чашки Петри, пипетки, шпатель.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; ГРМ-агар с добавлением 1 % глюкозы и 5 % дрожжевого экстракта; Сабуро (рН=5,5); среда Чистовича; среда Эндо.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Разведение исследуемого субстрата и посев на питательные среды

1. Приготовить среду Эндо, разлить по чашкам.
2. Расплавить простерилизованные питательные среды, разлить их по чашкам.
3. физиологический раствор разлить в 3 пробирки по 0,9 мл.
4. Произвести разведение исследуемого субстрата. Для этого 0,1 г субстрата растереть в ступке с 0,9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 1:10), произвести последующие разведения в пробирках до 10^{-4} .
5. Произвести ориентировочную оценку микробной обсеменённости исследуемого субстрата методом Брида:
 - на предметном стекле начертить квадрат со стороной 2 см;
 - из разведения 1:10 взять микропипеткой 0,01 мл взвеси, нанести на предметное стекло и растереть по всей площади квадрата;
 - полученный препарат высушить, зафиксировать и окрасить по Граму;
 - подсчитать количество клеток в 10 – 50 полях зрения по диагонали препарата, найти среднее число клеток в одном поле зрения (N);
 - найти коэффициент пересчёта K , который выражает отношение площади препарата (преп.) к площади поля зрения микроскопа:

$$K = S_{\text{преп.}} / S_{\text{поля зрения}}$$

$$S_{\text{преп.}} = 400 \text{ мм}^2, S_{\text{поля зрения}} = \pi \times R^2$$

(радиус поля зрения измерить с помощью окуляр-микрометра, значение выразить в миллиметрах);

- найти количество микроорганизмов в препарате (A) по формуле:

$$A = N \times K;$$

- найти количество микроорганизмов в 1 мл взвеси ($A \times 100$);

- учитывая разведение, из которого был сделан препарат, произвести расчёт количества микроорганизмов, содержащихся в 1 г субстрата.

6. Опираясь на полученные результаты, сделать вывод, из каких разведений наиболее целесообразно сделать высевы на питательные среды.

7. По 0,1 мл взвеси выбранного разведения субстрата нанести на питательные среды, растереть шпателем. Чашки с посевами поставить на инкубацию при 28 °С (ГРМ-агар, Сабура) и 37 °С (ГРМ-агар с глюкозой и дрожжевым экстрактом, Эндо, Чистовича).

3 д е н ь

Определение КМАФАнМ исследуемого субстрата. Отсев двух доминирующих культур для дальнейшей идентификации. Подготовка питательных сред для изучения биохимических свойств

1. На чашках с ГРМ-агаром подсчитать число выросших колоний, определить КМАФАнМ исследуемого субстрата (количество колониобразующих единиц (КОЕ), содержащихся в 1 г продукта).

2. Приготовить мазки из всех типов колоний, выросших на разных питательных средах, окрасить их по Граму.

3. Описать культуральные и морфологические признаки микроорганизмов, выросших на разных средах, рассчитать их количественные показатели.

4. При наличии специфического роста на средах Эндо и Чистовича сделать вывод о наличии в исследуемом объекте условно-патогенных микроорганизмов (бактерий группы кишечной палочки и стафилококков).

5. Выбрать два вида колоний, отсеять их на скошенный ГРМ-агар для дальнейшей идентификации.

6. Учитывая морфологию отобранных культур, подготовить среды для изучения биохимических свойств, необходимых для их идентификации (табл. 1).

4 д е н ь

Изучение биохимических свойств отобранных для идентификации штаммов

1. Из культур, выросших на скошенном агаре, приготовить мазки, окрасить их по Граму.

2. При наличии на скошенном агаре чистых культур произвести их посев на питательные среды для изучения биохимической активности.

3. Определить наличие каталазы, оксидазы, подвижности у исследуемых культур (используются только суточные культуры!).

5 день**Идентификация штаммов**

По определителю бактерий Берджи идентифицировать исследуемые штаммы.

Таблица 1

**Биохимические тесты, необходимые для идентификации
различных групп бактерий**

Тесты	Морфологические формы			
	Г- палочки	Г+ неспоровые палочки	Г+ споровые палочки	Г+ кокки
Подвижность	+	+	-	+
Отношение к кислороду	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	-	+
Рост при 10 °С	-	-	-	+
Рост при 45 °С	-	-	-	+
Образование H ₂ S	+	-	-	-
Образование NH ₃	+	-	-	-
Образование индола	+	+	-	-
Тест Фогес-Проскауэра	+	-	+	-
Расщепление цитрата	+	-	+	-
Восстановление нитратов	-	+	+	-
Гидролиз желатины	+	+	+	-
Гидролиз казеина	-	+	+	-
Гидролиз крахмала	-	+	+	-
Гидролиз мочевины	+	-	-	-
Образование кислоты из				
глюкозы	+	+	+	+
арабинозы	+	+	+	-
маннита	+	+	+	-
сорбита	+	+	-	-
сахарозы	+	+	-	-
маннозы	+	+	-	-
лактозы	+	+	-	-
мальтозы	+	+	-	-

Примечание. «+» - тест проводится; «-» - тест не проводится.

Контрольные вопросы

1. Методы отбора проб для бактериологического анализа.
2. Методы количественного учёта микроорганизмов в различных субстратах.
3. Питательные среды, используемые для выделения грибов.
4. Питательные среды, используемые для выделения бактерий группы

кишечной палочки.

5. Питательные среды, используемые для выделения стафилококков.
6. Культуральные свойства микроорганизмов, методы их изучения.
7. Морфологические свойства микроорганизмов, методы их изучения.
8. Методы выявления способности микроорганизмов к росту в анаэробных условиях.
9. Изучение сахаролитических свойств микроорганизмов.
10. Методы выявления способности микроорганизмов к гидролизу желатины, казеина, мочевины, крахмала.
11. Методы выявления продукции сероводорода, индола, аммиака.
12. Методы выявления каталазной, оксидазной и лецитиназной активности.
13. Методы выявления способности микроорганизмов к редукции нитратов, цитрата.
14. Методы выявления способности микроорганизмов к росту при определённых значениях pH, температуры, концентрации NaCl.
15. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамотрицательных палочек.
16. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамположительных неспоровых палочек.
17. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации споровых палочек.
18. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамположительных кокков.

Список рекомендуемой литературы

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 1. – 432 с.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 2. – 368 с.

Петерсон А.М., Чиров П.А. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 24 с.

Пивоваров Ю.П., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация). – М.: ИКАР, 2000. – 268 с.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практик. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.

Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995. – 319 с.

Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

ЗАДАЧА 2

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ

Вода является благоприятной средой для обитания и размножения различных микроорганизмов. Наиболее чистыми являются воды глубоких артезианских скважин, родниковые воды, наиболее загрязнёнными – открытые водоёмы (реки, озёра) вблизи городов. В чистых водоёмах до 80 % всей аэробной сапрофитной микрофлоры составляют кокковые формы, 20 % – палочковидные. При загрязнении водоёмов органическими отбросами резко увеличивается концентрация палочковидных микроорганизмов. Микрофлора воды выполняет роль активного фактора в процессе самоочищения её от органических отходов.

Вместе с загрязнёнными ливневыми, тальными и сточными водами в водоёмы попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных: *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus* и др., а также возбудители кишечных инфекций – брюшного тифа (*Salmonella typhi*) и паратифов (*Salmonella paratyphi*), холеры (*Vibrio cholerae*), лептоспироза (*Leptospira interrogans*), энтеровирусных инфекций. Патогенные бактерии не способны размножаться в воде, но могут сохраняться и выживать в ней определённое время.

О безопасности какого-либо источника в эпидемиологическом отношении судят по результатам его санитарно-бактериологического исследования. Обнаружить в воде патогенные микроорганизмы чрезвычайно сложно ввиду их малой концентрации. Поэтому о качестве воды судят по содержанию в ней санитарно-показательных микроорганизмов, которые должны отвечать следующим требованиям:

- они должны постоянно содержаться в выделениях человека и теплокровных животных и поступать в окружающую среду в больших количествах;
- не должны иметь другого природного резервуара, кроме организма человека и животных;
- после выделения в окружающую среду они должны сохранять жизнеспособность в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями;
- не должны размножаться в окружающей среде;
- не должны значительно изменять свои биологические свойства в окружающей среде;
- должны быть достаточно типичными, чтобы их дифференциальная диагностика осуществлялась без особого труда.

В связи с этим в качестве санитарно-показательных микроорганизмов обычно используют постоянных обитателей полостей тела человека и животных: кишечную палочку и её разновидности, энтерококки, спорообразующие анаэробы.

При оценке санитарного состояния воды определяют следующие показатели:

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-

анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на питательном агаре при температуре 37 °С в течение 24 ч, видимые с увеличением в 2 раза.

Колиформные бактерии – грамотрицательные аспорогенные оксидазонегативные бактерии, растущие на среде Эндо и ферментирующие лактозу с образованием кислоты, альдегида и газа при 37 °С в течение 48 ч. Служат показателем фекального загрязнения воды.

Термотолерантные колиформные бактерии входят в число общих колиформных бактерий, обладают теми же признаками и, кроме того, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при температуре 45 °С в течение 24 ч. Служат показателями свежего фекального загрязнения.

Коли-титр – наименьший объём воды, в котором обнаруживают колиформные бактерии.

Коли-индекс – количество колиформных бактерий в 100 мл воды.

Коли-фаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса (бляшки) через 18 ч при температуре 37 °С на её газоне на ГРМ-агаре. Служат показателем наличия в воде энтеровирусов.

Сульфитредуцирующие клостридии (преимущественно *Clostridium perfringens*) – спорообразующие анаэробные грамположительные палочки, редуцирующие сульфит натрия на железо-сульфитном агаре при температуре 45 °С в течение 24 ч. Служат показателем давнего фекального загрязнения.

Цель работы: определить КМФАнМ, коли-титр и коли-индекс исследуемого образца воды, установить наличие в нём термотолерантных колиформных бактерий, сульфитредуцирующих клостридий и колифагов. Дать заключение о качестве исследованной воды.

Оборудование:

Посуда: бутылка для взятия пробы воды объёмом 0,5 л (перед стерилизацией бутылку закрыть ватно-марлевой пробкой, к горлышку бутылки привязать резиновую пробку, завернутую в бумагу); пипетка Мора на 100 мл; пипетки на 10 мл, 5 мл и 1 мл; пробирки .

Питательные среды: физиологический раствор; глюкозо-пептонная среда (3 пробирки по 10 мл с поплавками); концентрированная глюкозо-пептонная среда (3 колбы по 10 мл и 3 пробирки по 1 мл с поплавками); ГРМ-агар; концентрированный ГРМ-агар (навеску сухого препарата увеличить на ¼ от прописи); железо-сульфитный агар (прил. 1).

* За 1 сутки до исследования воды необходимо отсеять культуру *E. coli* на скошенный ГРМ-агар.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Посев исследуемой пробы воды на питательные среды

1. Произвести посев воды для определения КМАФАнМ:

- приготовить разведение исследуемой воды. Для этого 1 мл пробы поместить в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 10^{-1}). Из полученной взвеси сделать последующие десятикратные разведения до 10^{-4} ;

- из разведений 10^{-3} и 10^{-4} по 1 мл вылить в стерильные чашки Петри, залить расплавленным и охлаждённым до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ГРМ-агаром, тщательно перемешать. Поставить на инкубацию при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Произвести посев воды для определения коли-титра и коли-индекса.

Титрационный метод определения коли-титра и коли-индекса основан на накоплении бактерий после посева установленного объёма воды в жидкую питательную среду, с последующим пересевом на дифференциальную среду Эндо и дальнейшей идентификацией колоний по культуральным и биохимическим тестам:

- осуществить посев воды: по 100 мл в 3 колбы с 10 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды, по 10 мл в 3 пробирки с 1 мл концентрированной глюкозо-пептонной среды, по 1 мл в 3 пробирки с 10 мл глюкозо-пептонной среды. Поставить на инкубацию при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Произвести посев воды для определения наличия сульфитредуцирующих клостридий.

Прямой метод определения спорных сульфитредуцирующих клостридий основан на посеве установленного объёма воды в пробирки с железосульфитным агаром, инкубации посевов при температуре $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч и подсчёте чёрных колоний:

- в 4 пробирки налить по 5 мл исследуемой воды, прогреть на водяной бане при температуре $70 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. для уничтожения вегетативных клеток;

- каждую пробирку с водой залить 10 мл горячего ($70 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) железосульфитного агара; среду заливать по стенке пробирки, избегая образования пузырьков воздуха;

- пробирки быстро охладить, поставить на инкубацию при $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Определить наличие коли-фагов прямым методом.

Принцип прямого метода определения колифагов заключается в исследовании 100 мл воды путём его прямого посева и последующего учёта зон лизиса (бляшек) на газоне *E. coli* в чашках Петри с ГРМ-агаром. Для контроля используют чашку с чистым газоном *E. coli* на ГРМ-агаре. Нижний предел определения колифагов – 1 БОЕ (бляшкообразующая единица) в 100 мл воды:

- сделать смыв суточной культуры *E. coli* на скошенном ГРМ-агаре и по стандарту мутности приготовить взвесь *E. coli* в концентрации 10^9 м.к. в 1 мл;

- концентрированный питательный агар расплавить и остудить до $45\text{ }^{\circ}\text{C}$;

- в остуженный агар добавить взвесь *E. coli* из расчёта 1,5 мл взвеси бактерий на 150 мл агара, осторожно перемешать;

- в 5 стерильных чашек Петри внести по 20 мл исследуемой воды и по 30 мл агара с *E. coli*; содержимое чашек осторожно перемешать; в 1 пустую стерильную чашку налить 20 мл агара с *E. coli* (контроль); чашки оставить при комнатной температуре для застывания на 30 мин, затем поместить в термостат для инкубирования при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3 д е н ь

Учёт результатов посева пробы воды на питательные среды. Определение КМАФАнМ, наличия сульфитредуцирующих клостридий и колифагов

1. Определить показатель КМАФАнМ:

- подсчитать количество колоний, выросших на чашках с ГРМ-агаром;
- учитывая разведения, из которых были сделаны высевы, произвести расчёт КМАФАнМ;

- приготовить мазки из различных видов колоний, окрасить по Граму, промикроскопировать; сделать вывод о преобладании кокковой или палочковидной микрофлоры.

2. Пересеять культуры, выросшие на глюкозо-пептонной среде, на среду Эндо для дальнейшего определения коли-титра и коли-индекса исследуемой пробы воды:

- приготовить среду Эндо, разлить по чашкам;
- отобрать пробирки и колбы, где наблюдается бактериальный рост, сопровождающийся расщеплением глюкозы и газообразованием;
- из отобранных сосудов сделать высев бактериологической петлёй на среду Эндо для получения изолированных колоний. На чашках сделать надписи, из каких колб или пробирок сделан высеv. Поставить на инкубацию при 37 °С.

3. Определить наличие сульфитредуцирующих клостридий:

- подсчитать количество чёрных глубинных колоний, выросших в четырёх пробирках;
- результат анализа выразить числом КОЕ спор сульфитредуцирующих клостридий, содержащихся в 20 мл воды.

4. Определить наличие колифагов прямым методом:

- подсчитать и суммировать число бляшек, образовавшихся на 5 чашках Петри. В контрольной чашке бляшки колифагов должны отсутствовать.
- результаты выразить в количестве бляшкообразующих единиц в 100 мл пробы воды.

4 д е н ь

Учет результатов посевов на среде Эндо

1. Просмотреть посевы на среде Эндо. Отобрать лактозоположительные колонии (малиновые с металлическим блеском или без него), образующие альдегид. Наличие альдегида можно проверить по отпечатку на среде, если петлёй отодвинуть подозрительную колонию.

2. Отобрать среди них оксидазоотрицательные колонии, из отобранных колоний сделать мазки, окрасить по Граму.

3. При наличии в мазках грамотрицательных палочек произвести их пересев на две пробирки с полужидкой средой Гисса с лактозой для выявления их способности к газообразованию при расщеплении лактозы. На пробирках сделать надписи, из каких объёмов засеянной воды выделена данная культура. Одну пробирку поставить на инкубацию при 37 °С, другую – при 45 °С на 24 ч.

5 день**Определение коли-титра, коли-индекса и количества термотолерантных колиформных бактерий в исследуемой пробе воды**

1. Среди пробирок с посевами на среде Гисса с лактозой, инкубированными при 37 °С, отобрать те, где наблюдается активное газообразование. Учитывая, из каких объёмов воды выделены культуры колиформных бактерий, рассчитать коли-титр и коли-индекс исследованного образца воды (табл. 2).

2. Среди пробирок с посевами на среде Гисса с лактозой, инкубированными при 45 °С, отобрать те, где наблюдается активное газообразование. Учитывая, из каких объёмов воды выделены культуры термотолерантных колиформных бактерий, сделать вывод о содержании бактерий этой группы в 100 мл воды.

3. По полученным данным сделать общий вывод о качестве исследованной воды (табл. 3).

Таблица 2

Расчёт коли-индекса и коли-титра воды

Число положительных результатов в			Коли-индекс	Коли-титр
3-х объёмах по 100 мл	3-х объёмах по 10 мл	3-х объёмах по 1 мл		
0	0	1	0,3	333
0	0	2	0,6	167
0	0	3	0,9	111
0	1	0	0,3	333
0	1	1	0,6	167
0	1	2	0,9	111
0	1	3	1,2	83
0	2	0	0,6	167
0	2	1	0,9	111
0	2	2	1,2	83
0	2	3	1,6	62,5
0	3	0	0,9	111
0	3	1	1,3	77
0	3	2	1,6	62,5
0	3	3	1,9	53
1	0	0	0,4	250
1	0	1	0,7	143
1	0	2	1,1	91
1	0	3	1,5	67
1	1	0	0,7	143
1	1	1	1,1	91
1	1	2	1,5	67
1	1	3	1,9	53
1	2	0	1,1	91

Таблица 2 (продолжение)

1	2	1	1,5	67
1	2	2	2,0	50
1	2	3	2,4	42
1	3	0	1,6	62,5
1	3	1	2,0	50
1	3	2	2,4	42
1	3	3	2,9	34,5
2	0	0	0,9	111
2	0	1	1,4	72
2	0	2	2,0	50
2	0	3	2,6	38,5
2	1	0	1,5	67
2	1	1	2,0	50
2	1	2	2,7	37
2	1	3	3,4	29
2	2	0	2,1	48
2	2	1	2,8	86
2	2	2	3,5	29
2	2	3	4,2	24
2	3	0	2,9	34,5
2	3	1	3,6	28
2	3	2	4,4	23
2	3	3	5,3	19
3	0	0	2,3	43
3	0	1	3,9	26
3	0	2	6,4	16
3	0	3	9,5	10,5
3	1	0	4,3	23
3	1	1	7,5	13
3	1	2	12,0	8
3	1	3	16,0	6
3	2	0	9,0	11
3	2	1	15,0	7
3	2	2	21,0	5
3	2	3	29,0	3,5
3	3	0	24,0	4
3	3	1	46,0	2
3	3	2	110,0	0,9
3	3	3	более 240	менее 0,9

Санитарно-микробиологические нормативы для воды (СанПиН 2.1.4.1074-74)

Вид источника	КМАФАнМ, КОЕ/мл	Коли-индекс	Коли-титр
Питьевая водопроводная вода	не более 100	не более 0,3	не менее 300
Вода артезианских скважин	не более 100	не более 0,2	не менее 500
Вода открытых водоёмов	не более 1000	не более 0,9	не менее 111

Контрольные вопросы

1. Микрофлора воды. Вода как среда обитания микроорганизмов.
2. Роль воды в распространении инфекционных болезней. Патогенные микроорганизмы, обитающие в воде.
3. Методы очистки воды.
4. Санитарная оценка воды по микробиологическим показателям.
5. Методы забора пробы воды для бактериологического анализа.
6. Методы определения КМАФАнМ воды.
7. Санитарно-показательные микроорганизмы. Требования, предъявляемые к ним.
8. Колиформные бактерии: общая характеристика, методы выявления. Распространение колиформных бактерий в природе.
9. Морфологические, культуральные, биохимические и серологические свойства *E. coli*.
10. Дифференциально-диагностические среды, используемые для выделения *E. coli*, характер роста на них *E. coli*.
11. Коли-титр и коли-индекс. Методы определения.
12. Сульфитредуцирующие клостридии: значение для санитарной оценки качества воды, методы выявления.
13. Коли-фаги: значение для санитарной оценки качества воды, методы выявления.

Список рекомендуемой литературы

Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. – 288 с.

Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды: Метод. указания МУК 4.2.671-97. / Минздрав России. – М., 1997. – 36 с.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. – Ростов: Феникс, 2002. – С.320 – 333.

Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – С.244 – 248.

ЗАДАЧА № 3

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ

Под почвой понимается поверхностный слой суши земного шара, который образуется в результате изменения горных пород при действии биоты, климата и других факторов почвообразования.

Почва является естественной средой обитания микроорганизмов, которые принимают активное участие в процессах формирования и самоочищения почвы, в круговороте веществ в природе.

Отличительная особенность почвы как природного местообитания микроорганизмов связана с ее гетерогенностью, которая проявляется в разных пространственных масштабах.

Пространственная гетерогенность почв на макроуровне видна в почвенном разрезе. Выявляются почвенные горизонты, которые отличаются друг от друга по цвету, плотности, влажности и другим признакам.

Почвенные микроорганизмы обитают в трехфазной полидисперсной среде, представленной твердой (минеральные и органические частицы), жидкой (почвенная вода) и газообразной (почвенный воздух) фазами. Твёрдые частицы и агрегаты делят почву на многочисленные микрзоны, в которых создаются чрезвычайно разнообразные условия.

Качественный состав микрофлоры почвы очень разнообразен, она включает многие виды бактерий, грибов, вирусов, простейших, водорослей. Состав и соотношение между различными группами микроорганизмов меняются в зависимости от типа почвы, способов ее обработки, содержания химических веществ.

Почва играет определенную роль в передаче возбудителей инфекционных болезней человека. Патогенные для человека бактерии, которые могут быть обнаружены в почве, можно разделить на три группы:

К первой группе относится небольшое число постоянно обитающих в почве микроорганизмов, которые попадают в почву с испражнениями человека и животных и, образуя споры, сохраняются в почве (*Clostridium botulinum*).

Вторая группа включает спорообразующие патогенные микроорганизмы, которые также попадают в почву с фекалиями человека и испражнениями животных, однако почва является для них вторичным резервуаром (*Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*).

В третью группу включены патогенные микроорганизмы, попадающие в почву с выделениями человека и животных и сохраняющиеся в течение нескольких недель или месяцев (*Salmonella*, *Vibrio*).

Предупредительный санитарный надзор за почвой осуществляется при планировке, строительстве и реконструкции вновь заселяемых участков и населенных мест; при выборе участков для строительства лечебно-профилактических аптечных учреждений, санаториев, детских учреждений; при решении вопросов водоснабжения и канализации населенных территорий; при санитарной оценке пляжей и других мест коллективного пользования.

Текущий санитарный надзор за почвой осуществляется при оценке

санитарного состояния почвы и ее способности к самоочищению после загрязнения; при контроле за методами обезвреживания сточных вод и отбросов; по эпидемическим показаниям для выяснения возможного пути передачи инфекционных заболеваний.

Проведение санитарно-микробиологического анализа включает определение следующих показателей: КМАФАнМ, наличие бактерий группы кишечной палочки; количество энтерококков; наличие патогенных бактерий, в том числе сальмонелл; количество целлюлозоразлагающих бактерий.

Цель работы: определить КМАФАнМ, наличие бактерий группы кишечной палочки; количество энтерококков, наличие целлюлозоразлагающих бактерий. Дать заключение о качестве исследованного образца почвы.

Оборудование:

Посуда: колбы; пробирки, чашки Петри, пипетки на 1 мл.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; среда Кесслер; Энтерококкагар; голодный агар, фильтровальная бумага, среда Виноградского (прил. 1).

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Посев исследуемой пробы почвы на питательные среды

1. Произвести посев почвы для определения КМАФАнМ:

- приготовить разведение исследуемой пробы почвы. Для этого 1 г пробы поместить в колбу с 99 мл стерильного физиологического раствора (разведение 10^{-2}). Из полученной взвеси сделать последующие десятикратные разведения до 10^{-6} ;

- из разведений 10^{-5} и 10^{-6} по 1 мл вылить в стерильные чашки Петри, залить расплавленным и охлажденным до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ГРМ-агаром, тщательно перемешать. Поставить на инкубацию при $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Произвести посев почвы для определения бактерий группы кишечной палочки.

- 10 мл почвенной взвеси из разведения 10^{-2} засеять в колбу с 50 мл среды Кесслер;

- по 1 мл из разведений 10^{-3} , 10^{-4} внести в пробирки с 9 мл среды Кесслер.

- посевы поставить на инкубацию в термостат при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Произвести посев почвы для определения наличия энтерококков.

- из разведения 10^{-2} 0,1 мл взвеси нанести на поверхность Энтерококкагара и растереть шпателем. Поставить на инкубацию при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Определить наличие целлюлозоразлагающих бактерий:

- расплавленный голодный агар разлить в стерильные чашки Петри;

- на поверхность агаровой пластинки положить кружок фильтровальной бумаги, пропитанной средой Виноградского.

- на фильтровальную бумагу разложить комочки смоченной почвы и

поставить в термостат при 28 °С.

3 д е н ь

Учёт результатов посева пробы почвы на питательные среды. Определение КМАФАнМ, наличия энтерококков.

1. Определить показатель КМАФАнМ:

- подсчитать количество колоний, выросших на чашках с ГРМ-агаром;
- учитывая разведения, из которых были сделаны высевы, произвести расчёт КМАФАнМ;
- приготовить мазки из различных видов колоний, окрасить по Граму, промикроскопировать.

2. Пересеять культуры, выросшие на среде Кесслер, на среду Эндо для дальнейшего определения БГКП в исследуемой пробе почвы:

- приготовить среду Эндо и разлить по чашкам;
- отобрать пробирки и колбы, где наблюдаются признаки бактериального роста и газообразования;
- из отобранных сосудов сделать высев бактериологической петлёй на среду Эндо для получения изолированных колоний. На чашках сделать надписи, из каких колб или пробирок сделан высеv. Поставить на инкубацию при 37 °С.

- отсутствие через 48 ч газообразования и помутнения в колбах и пробирках со средой Кесслер позволяет дать отрицательное заключение о наличии БГКП.

3. Определить наличие энтерококков:

- подсчитать количество колоний, выросших на поверхности Энтерококкагара;

4. Определить наличие целлюлозоразлагающих бактерий:

- выявить наличие разноцветных (оранжевых, желтых, красных, зеленых) зон вокруг комочков почвы на поверхности фильтровальной бумаги;
- провести микроскопическое исследование целлюлозоразлагающих бактерий.

4 д е н ь

Учет результатов посевов на среде Эндо

1. Просмотреть посевы на среде Эндо. Отобрать лактозоположительные колонии (малиновые с металлическим блеском или без него), образующие альдегид. Наличие альдегида можно проверить по отпечатку на среде, если петлёй отодвинуть подозрительную колонию.

2. Отобрать среди них оксидазоотрицательные колонии, из отобранных колоний сделать мазки, окрасить по Граму.

3. При наличии в мазках грамотрицательных палочек произвести их пересев в две пробирки с полужидкой средой Гисса с лактозой для выявления их способности к газообразованию при расщеплении лактозы. Одну пробирку поставить на инкубацию при 37 °С, другую – при 45 °С на 24 ч.

5 д е н ь

Определение наличия БГКП в исследуемой пробе почвы

1. Среди пробирок с посевами на среде Гисса с лактозой, инкубированными при 37 °С, отобрать те, где наблюдается активное газообразование. Сделать вывод о наличии БГКП в исследуемой пробе почвы.

2. Среди пробирок с посевами на среде Гисса с лактозой, инкубированными при 45 °С, отобрать те, где наблюдается активное газообразование. Сделать вывод о наличии термотолерантных БГКП в исследуемой пробе почвы.

3. По полученным данным сделать вывод о качестве исследованной почвы.

Контрольные вопросы

1. Почва как среда обитания микроорганизмов. Физико-химические свойства почвы.
2. Микроорганизмы почвы. Примеры.
3. Роль почвы в распространении инфекционных болезней.
4. Основные группы патогенных микроорганизмов, способные сохраняться в почве.
5. Санитарно-микробиологическое исследование почвы.
6. Методы отбора проб почвы.
7. Санитарно-показательные микроорганизмы почвы.
8. Питательные среды для выделения основных групп санитарно-показательных микроорганизмов почвы.
9. Методы изучения микроорганизмов, участвующих в круговороте азота.
10. Азотфиксирующие микроорганизмы. Примеры.
11. Методы изучения микроорганизмов, участвующих в круговороте углерода.
12. Целлюлозоразлагающие микроорганизмы. Примеры.

Список рекомендуемой литературы

Сбойчаков В.Б. Санитарная микробиология.. М.: Гэотар-Медиа, 2007. – 192 с.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – С.244 – 248.

Донецкая Э.Г.-А., Корженевич В.И., Швиденко И.Г., Шуб Г.М. Основы санитарной микробиологии. Саратов: Изд-во СГМУ, 2008. – 221 с.

Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М. и др. Экология микроорганизмов. М.: Академия, 2004. – 272 с.

ЗАДАЧА №4

ИЗУЧЕНИЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КОЖИ

Нормальная микрофлора — это качественное и количественное соотношение разнообразных популяций микроорганизмов отдельных органов и систем, поддерживающее биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие организма, необходимое для сохранения здоровья человека.

Общее количество микроорганизмов у взрослого человека достигает 10^{14} микробных клеток, что на порядок больше числа клеток всех тканей человека.

Вся нормальная микрофлора человека подразделяется на резидентную (постоянную), которая составляет до 90% присутствующих в организме микроорганизмов), факультативную (менее 9,5%) и транзиторную (случайную) - до 0,5 %.

Распределение микроорганизмов в организме человека: полость рта - 20 %; кожные покровы - 18-20%, глотка - 15-16%, урогенитальный тракт мужчин - 2-4%, вагинальный биотоп женщин - 10 %, желудочно-кишечный тракт - 40%.

Микроорганизмы, присутствующие в организме человека, находятся между собой в разнообразных взаимоотношениях (нейтрализм, конкуренция, комменсализм и т.д.), однако преобладающими являются кооперативные взаимоотношения.

Микроорганизмы кожи присутствуют в эпидермисе, сальных железах, волосяных фолликулах, но отсутствуют в потовых железах.

В состав нормальной микрофлоры кожи входят анаэробные бактерии (*Propionibacterium acnes*), факультативные анаэробы (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), аэробы (*Micrococcus*, *Candida*).

Цель работы: определить видовой состав нормальной микрофлоры кожи человека.

Оборудование:

Посуда: пробирки, чашки Петри, ватные тампоны.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; среда Сабуро (прил. 1).

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 д е н ь

Посев смывов с поверхности кожи рук на питательные среды

Провести посев смывов с поверхности кожи рук:

- провести взятие материала с внутренней поверхности ладони с помощью ватного тампона, смоченного в стерильном физиологическом растворе;

- провести посев с помощью ватного тампона на поверхность ГРМ-агар и среды Сабуро;

- посеvy поставить на инкубацию в термостат при 37 °С.

3 день**Учёт результатов посева смывов с поверхности кожи рук на питательные среды**

1. Провести учет колоний микроорганизмов, выросших на разных питательных средах.
2. Приготовить мазки из всех типов колоний, выросших на разных питательных средах, окрасить по Граму.
3. Описать культуральные и морфологические признаки микроорганизмов, выросших на разных питательных средах.
4. Провести идентификацию выделенных бактерий (см. Задача 1).

Контрольные вопросы

1. Нормальная микрофлора человека.
2. Значение нормальной микрофлоры.
3. Типы взаимоотношений между микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры.
4. Пути формирования нормальной микрофлоры.
5. Биопленка: состав, функции.
6. Микрофлора кожи человека.
7. Методы выделения микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры.
8. Микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания кожи человека.

Список рекомендуемой литературы

1. Воробьёв А.А., Быков А.С., Пашков Е.П. и др. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Академия, 2011.
2. Калантаевская К. А. Морфология и физиология кожи человека. – М.: Наука, 1972. – С. 12-24.
3. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – С.-Пб.: Спец. литература, 2002. – 591 с.
4. Медицинская микробиология./ Под ред. А.М.Королюка, В.Б.Сбойчакова. – СПб., 2002
5. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.1. – М.: ГРАНТЬ, 1998. – 288 с.

ЗАДАЧА №5**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Антибиотики (от греч. anti bios – против жизни) – химиотерапевтические вещества, продуцируемые микроорганизмами, животными, растениями, а также синтетические продукты, которые обладают избирательной способностью угнетать рост микроорганизмов. Первый природный антибиотик был открыт в 1929 г. английским бактериологом А. Флемингом. При изучении плесневого

гриба *Penicillium notatum* А. Флеминг обнаружил вещество, задерживающее рост бактерий, и назвал его пенициллином. В 1940 г. Г. Флори и Э. Чейн получили очищенный пенициллин. В 1945 г. А. Флеминг, Г. Флори и Э. Чейн стали нобелевскими лауреатами.

К настоящему времени получено около 10000 различных антибиотиков, причём около 80 % продуцировано актиномицетами. Среди актиномицетов основное значение имеют представители рода *Streptomyces*, являющиеся продуцентами стрептомицина, эритромицина, левомицетина и т.д. Из грибов получены такие антибиотики, как пенициллины, гризеофульвин (род *Penicillium*), цефалоспорины (род *Cephalosporium*). Среди собственно бактерий основными продуцентами антибиотиков (полимиксины, бацитрацин, грамицидин и т.д.) служат представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

После изучения структуры природных антибиотиков стало возможным их получение путём химического синтеза. Одним из первых препаратов, полученных таким методом, был левомицетин. Кроме того, с помощью этого метода были созданы все синтетические антибиотики. В последнее время широкое распространение получили полусинтетические антибиотики. В этом случае из природного антибиотика выделяют так называемое ядро (например, б-аминопенициллановую кислоту из пенициллина) и химическим путём добавляют к нему различные радикалы. Достоинством полусинтетических антибиотиков является чувствительность к ним микроорганизмов, устойчивых к природным антибиотикам.

По спектру действия антибиотики делят на пять групп: антибактериальные, противогрибковые, антипротозойные, противовирусные и противоопухолевые.

Действие антибиотиков на микроорганизмы связано с их способностью подавлять те или иные биохимические реакции, происходящие в клетке. В зависимости от механизма действия различают пять групп антибиотиков:

1. антибиотики, нарушающие синтез клеточной стенки (β -лактамы);
2. антибиотики, нарушающие молекулярную организацию и синтез клеточных мембран (полимиксины, полиены);
3. антибиотики, нарушающие синтез белка (тетрациклины, макролиды, левомицетин);
4. антибиотики – ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот (хинолоны, рифампицин);
5. антибиотики, подавляющие синтез пуринов и аминокислот (сульфаниламиды).

Антибактериальное действие антибиотиков может быть бактерицидным, т.е. вызывающим гибель бактерий, и бактериостатическим – задерживающим рост и развитие бактерий.

Существуют три условия, при которых антибиотик может оказать бактерицидное или бактериостатическое действие на микробную клетку:

1. антибиотик должен проникнуть в клетку;
2. антибиотик должен вступить во взаимодействие с так называемой мишенью, т.е. структурой (например, бактериальной рибосомой, ДНК и др.),

которая выполняет важную для жизнедеятельности бактерий функцию и подавить эту функцию;

3. антибиотик должен при этом сохранить свою структуру.

Если одно из этих условий не выполняется, бактерия приобретает устойчивость.

Возможны следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам: изменение проницаемости клеточных мембран для антибиотика; изменение мишени действия антибиотика; появление ферментов, превращающих активную форму антибиотика в неактивную.

Возникновение антибиотикорезистентности может быть связано с изменениями, возникающими в результате мутаций, в самой бактериальной хромосоме (хромосомная устойчивость) или в R-плазмидах (внехромосомная устойчивость).

Для проведения эффективной антибиотикотерапии необходимо выявлять чувствительность возбудителя к различным антибиотикам (антибиотикограмму) и минимальную бактериостатическую дозу наиболее эффективного препарата.

Цель работы: определить спектр чувствительности исследуемой культуры к антибиотикам диско-диффузным методом; выбрать наиболее эффективный антибиотик, методом последовательных разведений определить его минимальную бактериостатическую дозу для исследуемой культуры.

Оборудование:

Посуда: пробирки, чашки Петри, пипетки, шпатель.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; ГРМ-бульон; среда АГВ; вода.

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

*Отсеять исследуемую культуру на скошенный ГРМ-агар.

**За сутки до проведения дальнейшей работы исследуемую культуру отсеять на ГРМ-бульон.

2 д е н ь

Посев исследуемой культуры для определения спектра ее чувствительности к антибиотикам диско-диффузным методом

1. Произвести посев исследуемой культуры на питательную среду для определения спектра ее чувствительности к стандартным антибиотикам:

- питательную среду АГВ разлить в две чашки Петри, дать застыть, подсушить в течение 30 – 40 мин.;

- на поверхность подсушенной питательной среды в чашках Петри нанести по 1 мл суточной бульонной культуры исследуемого штамма, равномерно распределить по чашкам путём покачивания, избыток бульонной

культуры удалить пипеткой;

- после посева чашки подсушить при комнатной температуре в течение 10 – 15 мин.;

- диски с антибиотиками наложить пинцетом на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки (на 1 чашку накладывать не более 6 дисков). Чашки инкубировать при 37 °С.

2. Произвести посев исследуемой культуры на питательную среду для определения спектра ее чувствительности к антибиотикам растительного происхождения:

- разлить ГРМ-агар в две чашки Петри;

- на поверхность подсушенной питательной среды в чашках Петри нанести по 1 мл суточной бульонной культуры исследуемого штамма, равномерно распределить по чашкам путём покачивания, избыток бульонной культуры удалить пипеткой; посевы подсушить при комнатной температуре в течение 10 – 15 мин;

- на чашках с газоном исследуемого возбудителя стерильным инструментом вырезать блочки (5 – 6 штук), их место заполнить расплавленным стерильным агаром;

- на участки стерильного агара нанести по 1 капле настоев, отваров, экстрактов растений, обладающих антимикробной активностью (лук, чеснок, хвоя сосны, кровохлёбка, календула и т.д.). Чашки инкубировать при 37 °С.

*За сутки до проведения дальнейшей работы исследуемую культуру отсеять на скошенный ГРМ-агар.

3 д е н ь

Определение спектра чувствительности исследуемой культуры к антибиотикам. Посев для определения минимальной бактериостатической дозы наиболее эффективного антибиотика

1. Просмотреть чашки с дисками стандартных антибиотиков в проходящем свете. С помощью линейки измерить диаметр зон задержки роста вокруг дисков. При нечетко очерченных краях зон или зонах с двойными контурами следует измерять диаметр зоны по наиболее чёткому контуру. Оценить полученные результаты (табл. 4).

2. Просмотреть чашки с посевами исследуемой культуры и растительными субстратами. С помощью линейки измерить диаметр зон задержки роста вокруг мест нанесения растительных субстратов. Сделать вывод о чувствительности исследуемой культуры к антибиотикам растительного происхождения.

3. Произвести посев исследуемой культуры в пробирки с разной концентрацией наиболее эффективного антибиотика для определения его минимальной бактериостатической дозы:

- отобрать наиболее эффективный антибиотик;

- приготовить его исходное разведение в стерильной дистиллированной воде (концентрация 200 мкг/мл (ЕД/мл);

- в 11 стерильных пробирок налить по 1 мл ГРМ-бульона;

- в первую пробирку внести 1 мл исходного разведения антибиотика, произвести дальнейшие двукратные разведения препарата. Из предпоследней пробирки удалить 1 мл смеси. В последнюю пробирку антибиотик не добавляют (контроль);

- по стандарту мутности на 10 ед. приготовить взвесь исследуемой культуры в концентрации 10^6 м.к./мл;

- внести во все пробирки с разведениями антибиотика и в контрольную по 0,1 мл приготовленной взвеси;

- посевы инкубировать при температуре 37 °С.

Таблица 4

Оценка результатов определения чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузным методом на среде АГВ

Антибиотики	Диаметр зон задержки роста, мм		
	устойчивых бактерий	средне-устойчивых бактерий	чувствительных бактерий
Бензилпенициллин: для стрептококков	≤20	21 – 28	≥29
для других бактерий	≤10	11 – 16	≥17
Ампициллин: для стафилококков	≤20	21 – 28	≥29
для грам- бактерий	≤9	10 – 13	≥14
Метициллин	≤13	14 – 18	≥19
Оксациллин	≤15	16 – 19	≥20
Цефалексин	≤11	12 – 16	≥17
Стрептомицин	≤16	17 – 19	≥20
Канамицин	≤14	15 – 18	≥19
Неомицин	≤12	13 – 16	≥17
Гентамицин	≤15	-	≥16
Тетрациклин	≤16	17 – 21	≥22
Доксициклин	≤12	13 – 19	≥20
Эритромицин	≤17	18 – 21	≥22
Олеандомицин	≤16	17 – 20	≥21
Левомецетин	≤12	13 – 15	≥16
Рифампицин	≤12	13 – 15	≥16
Фузидин	≤12	13 – 19	≥20
Полимиксин	≤11	12 – 14	≥15

4 день**Определение минимальной бактериостатической дозы антибиотика**

Просмотреть посеы исследуемой культуры на средах с различными концентрациями антибиотика. Отметить последнюю пробирку с признаками бактериального роста и первую пробирку с задержкой роста микробов. Рассчитать концентрации антибиотика в этих двух пробирках, найти их среднее арифметическое. Полученное значение будет являться минимальной концентрацией данного антибиотика, ингибирующей рост исследуемого штамма микроба.

Контрольные вопросы

1. Классификация антибиотиков по химическому строению, происхождению, спектру действия.
2. Антибиотики, продуцируемые актиномицетами, грибами, бактериями, растениями, животными.
3. Механизмы действия антибиотиков на бактериальные клетки.
4. Механизмы лекарственной устойчивости бактерий.
5. Побочное действие антибиотиков на организм человека и животных.
6. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузным методом.
7. Бактерицидное и бактериостатическое действие антибиотиков. Определение минимальной бактериостатической дозы антибиотика.
8. Биотехнологические методы получения антибиотиков.
9. Фитонциды: основные продуценты, механизм действия фитонцидов на бактериальные клетки.
10. Практическое применение фитонцидов.

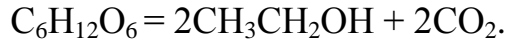
Список рекомендуемой литературы

- Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология. – М.: Медицина, 1998. – 335 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – 526 с.
- Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед. вузов. – 3-е изд., испр и доп. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591 с.
- Медицинская микробиология / Под ред. А.М. Королюка и В.Б. Сбойчакова. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2002. – 268 с.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

ЗАДАЧА № 6

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ И ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Спиртовое брожение – это процесс превращения углеводов с образованием этилового спирта:



Помимо этилового спирта и углекислого газа в процессе брожения образуются сивушные масла, большую часть которых составляют высокомолекулярные спирты.

Наиболее эффективными продуцентами этанола являются дрожжи. У некоторых бактерий (*Zygomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi* и др.) этиловый спирт также является главным или побочным продуктом сбраживания гексоз или пентоз, однако практическое значение имеет лишь спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами.

Дрожжи встречаются на поверхности растений, плодов, в воздухе, в почве. Это одноклеточные неподвижные организмы диаметром 8 – 15 мкм округлой или овальной формы. Клетки дрожжей могут иметь включения в виде капель жира, волютина, гликогена.

Основным источником углерода для дрожжей служат сахара, источником азота – пептоны, аминокислоты и аммонийные соли. Дрожжи устойчивы к высоким концентрациям сахара (до 70%) и спирта (до 14%), хорошо развиваются при pH 4 – 6.

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи исполняют роль биологических разрыхлителей теста.

Цель работы: выделить чистые культуры диких штаммов дрожжей из природных объектов (фрукты и их соки), изучить эффективность процесса спиртового брожения, осуществляемого данными штаммами.

Оборудование:

Посуда: чашки Петри, пипетки, шпатели, тампоны для смыва, колбы на 50 мл, затвор Мейселя.

Питательные среды: физиологический раствор; среда Сабуро; синтетическая среда для культивирования дрожжей (прил. 1).

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 д е н ь

Закладка спиртового брожения, вызываемого дикими штаммами дрожжей.

Выделение чистой культуры диких штаммов дрожжей

1. С помощью стерильного ватного тампона произвести смыв с поверхности плодов (виноград, яблоки, др.) и его посев на среду Сабуро.

2. Из невымытых ягод или фруктов приготовить 500 мл сока, 0,1 мл сока

засеять на чашку Петри со средой Сабуро.

3. К 500 мл сока добавить 10 г сахарозы, 50 мл водопроводной воды (количество добавляемой сахарозы и воды может варьировать в зависимости от сладости сока). Сосуд закрыть пробкой с газоотводной трубкой и поместить в термостат на 28 °С.

3 д е н ь

Микробиологический контроль процесса спиртового брожения, вызываемого дикими штаммами дрожжей. Выделение чистой культуры диких штаммов дрожжей

1. Произвести качественный и количественный учет дрожжевых клеток в сброживаемом соке:

- приготовить мазок из сока в стадии брожения. Окрасить по Граму. Промикроскопировать. Отметить морфологические особенности дрожжевых клеток;

- 0,1 мл этого сока засеять на чашку со средой Сабуро для количественного учета содержания дрожжевых клеток в сброживаемом субстрате. Подобные посева необходимо производить через каждые пять дней до окончания активного брожения.

2. Проанализировать посева сока и смыва с поверхности плодов:

- из колоний, выросших на чашках со средой Сабуро, приготовить мазки, окрасить по Граму, промикроскопировать;

- на чашке с посевом 0,1 мл сока подсчитать выросшие колонии. Произвести расчёт содержания клеток разных видов дрожжей в 1 мл сока до начала процесса брожения;

- изолированную колонию доминирующего вида дрожжей отсеять на скошенную среду Сабуро для накопления чистой культуры.

4 д е н ь

Микробиологический контроль процесса спиртового брожения, вызываемого дикими штаммами дрожжей. Изучение фенотипических свойств выделенного дикого штамма дрожжей. Закладка опыта по выявлению эффективности спиртового брожения, осуществляемого выделенным штаммом дрожжей

1. Произвести качественный и количественный учет дрожжевых клеток в сброживаемом соке (см. 3 день).

2. Изучить фенотипические свойства выделенного дикого штамма дрожжей:

- приготовить мазок из культуры дрожжей на скошенной среде Сабуро. Окрасить по Граму. Убедиться в чистоте полученной культуры;

- приготовить мазки из чистой культуры дрожжей, окрасить их на выявление включений каплей жира (поли-В-оксимасляной кислоты) и волютина (прил. 2);

- из чистой культуры дрожжей приготовить препарат «раздавленная капля». На край покровного стекла нанести каплю раствора Люголя. Если в клетке имеются гранулы гликогена, то они окрасятся в красновато-коричневый цвет;

3. Заложить опыт по выявлению эффективности спиртового брожения, осуществляемого выделенным диким штаммом дрожжей:

- приготовить 20 мл синтетической среды для культивирования дрожжей в колбе на 50 мл (рис. 1). Среду не стерилизовать;

- приготовить смыв чистой культуры дрожжей (3 мл) со скошенной среды Сабуро. Внести полученный смыв в колбу с синтетической средой, перемешать;

- колбу закрыть каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля с резиновым клапаном Бунзена. В состав затвора Мейссля входят три стеклянные детали: внутренняя стеклянная трубка (1), один конец которой входит в колбу, а другой – во внутренний стеклянный резервуар (2), имеющий внизу отверстия, соединяющие его с внешним резервуаром (3), который имеет выход вверх и вниз. Выход вверх закрыт толстостенной резиновой трубкой с небольшим продольным разрезом (клапан Бунзена). Верхний конец резиновой трубки закрыт стеклянной бусинкой. Во внешний резервуар перед установкой затвора заливается концентрированная серная кислота так, чтобы она закрывала отверстия внутреннего резервуара. Затвор легко пропускает выделяющийся при брожении углекислый газ, но не даёт возможности наружному воздуху проникать в колбу. Испаряющаяся при инкубации в термостате влага, проходя через слой концентрированной серной кислоты, поглощается ею. Таким образом, изменение веса установки в процессе инкубации возможно только за счёт выделения углекислого газа, образующегося при брожении;

- установку взвесить с точностью до 0,01 г и поставить в термостат при 28 °С. Взвешивание установки производить ежедневно до прекращения уменьшения её веса

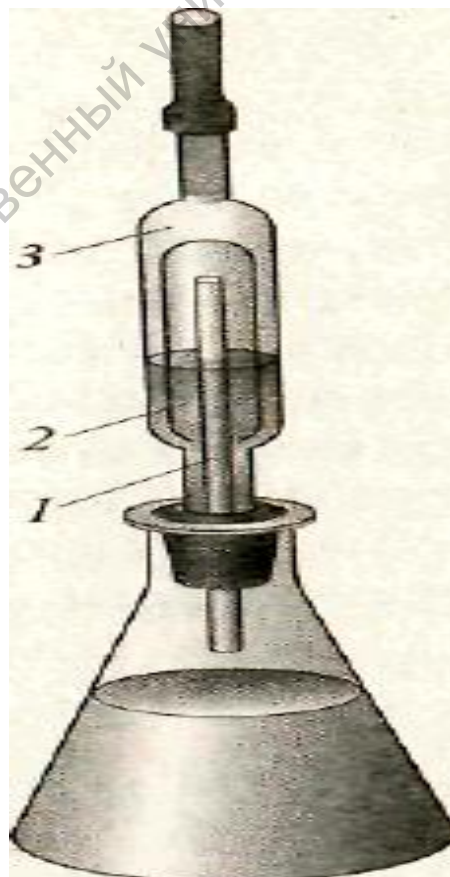


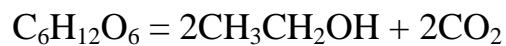
Рис. 1. Колба с затвором Мейссля

5 день**Анализ результатов изучения процесса спиртового брожения, вызываемого дикими штаммами дрожжей**

1. Произвести качественный и количественный учет дрожжевых клеток в сброживаемом соке (см. 3 день). Сделать вывод об изменении морфологии дрожжевых клеток в процессе созревания вина. Изменения количества дрожжевых клеток в сброживаемом соке отобразить графически (в виде диаграммы или графика).

2. После прекращения уменьшения веса установки с затвором Мейсля рассчитать количество образовавшегося спирта и сброженного сахара, а также интенсивность брожения:

- диоксид углерода, образующийся при брожении, определяют по разности массы колбы при постановки опыта и после его окончания. Несмотря на то, что колбу взвешивают только на технических весах, учет CO_2 получается достаточно точным, так как в процессе брожения его образуется много.



Глюкоза Этиловый спирт Диоксид углерода

Молекулярные массы 180 92 88

В опыте среда содержит 15 г сахара (см. состав синтетической среды для культивирования дрожжей). Расчет количества образовавшегося спирта и сброженного сахара проводят, исходя из массы выделившегося диоксида углерода в соответствии с уравнением спиртового брожения.

Пример расчета. В процессе брожения образовалось 6 г CO_2 . Находим массы выделившегося спирта (x) и сброженного сахара (y):

88 г CO_2 соответствуют 92 г $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

6 г CO_2 >> x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

$$x = (6 \times 92) / 88 = 6,3 \text{ (г)};$$

88 г CO_2 соответствуют 180 г $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

6 г CO_2 >> y $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

$$y = (6 \times 180) / 88 = 12,3 \text{ (г)}.$$

- интенсивность брожения определяют по отношению массы сброженного за определенный промежуток времени сахара к исходному его количеству в процентах.

Пример расчета. Если бы за время инкубации подверглись брожению все 15 г сахара, то интенсивность брожения составила бы 100 %. Однако в результате опыта было сброжено 12,3 г сахара:

15 г сахара соответствуют 100% интенсивности брожения

12,3 г сахара >> x интенсивности брожения

$$x = (12,3 \times 100) / 15 = 82 \text{ (\%)}.$$

3. Оценить органолептические свойства полученного молодого вина.

Контрольные вопросы

1. Систематическое положение и естественное местообитание дрожжей.
2. Методы получения чистой культуры дрожжей.
3. Морфологическая и биохимическая характеристика дрожжей.
4. Изучение способности дрожжей к спиртообразованию.
5. Виды и расы дрожжей, используемые в промышленности .
6. Общие условия спиртового брожения.
7. Механизм спиртового брожения (основные этапы, промежуточные продукты, ферменты).
8. Промышленное использование спиртового брожения (сырье, основные производства, получаемые продукты и их применение).

Список рекомендуемой литературы

- Биотехнология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Наука, 1984. – Т. 1. – 142 с.
- Биотехнология / Под ред. Н.С. Егорова и В.Д. Самуилова. – М.: Высш. шк., 1987. – 150 с.
- Воробьева Л.И. Техническая микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 168 с.
- Гулий В.В., Теплякова Т.В., Иванов Г.М. Микроорганизмы, полезные для биометода. – Новосибирск: Наука, 1981. – 256 с.
- Гусев М.Ю., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 400 с.
- Козлов К.А. Микроорганизмы на службе народного хозяйства. – М., 1970. – 183 с.
- Мишустин Е.Н., Емцев Е.Т. Микробиология. – М.: Колос, 1987. – 320 с.
- Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. Шк., 1989. – 194 с.
- Сассон А. Биотехнология. Свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 342 с.
- Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.

ЗАДАЧА № 7

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

Молоко – благоприятная среда для развития микроорганизмов. В молоке содержатся белок казеин в виде казеината, небольшое количество пептона, аминокислоты, жиры, сахара, минеральные соли, витамины. Поэтому при соответствующих температурных условиях в молоке бурно размножаются микроорганизмы. Известны два пути обсеменения молока: эндогенный и экзогенный. Эндогенное обсеменение молока происходит непосредственно в вымени животного. При экзогенном пути микроорганизмы попадают в молоко

из внешних источников: с поверхности вымени, кожи животного, кормов, посуды, оборудования, рук и одежды доильщиков, воздуха и воды. При соблюдении санитарных правил в молоке преобладают микрококки, молочнокислые бактерии, стрептококки, сарцины. Загрязненное молоко содержит значительное количество бактерий группы кишечной палочки, гнилостных и маслянокислых бактерий. Во время хранения изменяется количество содержащихся в молоке бактерий и соотношение отдельных видов.

При микробиологическом анализе молока на первом этапе проводится проба на редуктазу (анаэробная дегидрогеназа), которая накапливается в молоке при размножении в нем микроорганизмов. Количество редуктазы в молоке является показателем бактериальной обсемененности данного продукта. Затем определяется общая численность бактерий (КМАФАнМ) и коли-титр. Наличие бактерий группы кишечной палочки указывает на фекальное загрязнение молока. Коли-титр – наименьший объем молока (мл), в котором обнаружены бактерии группы кишечной палочки.

Значительное влияние на общую микробную обсеменённость молока оказывает его кислотность. Закисление продукта связано с расщеплением лактозы, накоплением молочной и других органических кислот. Кислотность молока определяется титрометрическим методом и выражается в градусах Тернера ($^{\circ}\text{T}$). Градус кислотности (кислотность) – количество миллилитров 0,1 н раствора NaOH (KOH), необходимого для нейтрализации кислот, содержащихся в 100 мл продукта. В свежем молоке кислотность обусловлена фосфорнокислыми солями, кислыми казеинами, амфотерными свойствами белков и составляет 16 – 19 $^{\circ}\text{T}$. Несвежее молоко имеет кислотность 23 $^{\circ}\text{T}$ и более. Кислотность ниже соды.

Цель работы: провести микробиологическое исследование молока, определить кислотность молока по Тернеру.

Оборудование:

Посуда: пробирки, чашки Петри, пипетки.

Питательные среды: физиологический раствор; дистиллированная вода; ГРМ-агар; среда Кесслера с поплавками; среда Эндо; среда Гисса с лактозой.

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред.

Приготовление насыщенного раствора метиленового синего

Для приготовления насыщенного раствора метиленового синего 1 г сухого метиленового синего развести в 10 мл 96 %-ного спирта и поставить в термостат при температуре 37 °С на 24 ч.

2 д е н ь

Постановка пробы на редуктазу. Определение кислотности молока по Тернеру. Разведение молока и посев на питательные среды для определения количества МАФАнМ и коли-титра

1. Провести пробу на редуктазу:

- приготовить рабочий раствор метиленового синего (непосредственно перед постановкой опыта). Для этого 0,5 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешать с 19,5 мл дистиллированной воды. Затем 1 мл полученного раствора смешать с 9 мл дистиллированной воды;

- в высокую пробирку налить 1 мл рабочего раствора метиленового синего и 20 мл молока, нагретого до 40 °С. Пробирку поставить в термостат при температуре 40 °С и наблюдать за обесцвечиванием через 20 мин, 2 ч и 5,5 ч. По времени обесцвечивания молока определить класс исследуемой пробы (табл. 6).

2. Определить кислотность молока по Тернеру:

- в коническую колбу (150 – 200 мл) налить 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина. Содержимое колбы перемешать;

Таблица 6

Определение качества молока по пробе на редуктазу

Показатели	Классы			
	I	II	III	IV
Время обесцвечивания метиленового синего	> 5,5 ч	2 – 5,5 ч	20 мин – 2 ч	< 20 мин
Примерная численность бактерий в 1 мл продукта	$< 0,5 \times 10^6$	$0,5 - 4 \times 10^6$	$4 - 20 \times 10^6$	$> 20 \times 10^6$
Качество молока	Хорошее	Удовлетворительное	Плохое	Очень плохое

- провести титрование 0,1 н раствором NaOH (KOH) до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Для определения градуса кислотности молока количество миллилитров 0,1 н раствора щелочи, израсходованного на титрование, необходимо умножить на 10 (для пересчёта на 100 мл исследуемой пробы).

3. Произвести посев молока для определения КМАФАнМ:

- 1 мл молока добавить в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 1:10), произвести последующие разведения до 10^{-5} ;

- по 0,1 мл взвеси из разведений молока 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} внести в стерильные чашки Петри, залить расплавленным и охлажденным до 45 °С ГРМ-агаром (глубинный посев). Чашки с посевами поставить на инкубацию при 28 °С.

4. Произвести посев молока на среду Кесслера для определения колититра. По 1 мл разведений молока 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} засеять в пробирки с 5 мл среды Кесслера с поплавками. Посевы поставить в термостат при 37 °С на 1 – 2 суток.

3 день

Определение КМАФАнМ, учет результатов посевов на среду Кесслера

1. Подсчитать число колоний, выросших на чашках с ГРМ-агаром, определить КМАФАнМ исследуемой пробы молока.

2. Учесть результаты посева молока на среду Кесслера. Положительный результат – помутнение среды и (или) образование газа.

3. Приготовить среду Эндо, разлить по чашкам. Из забродивших проб со средой Кесслера сделать высев бактериологической петлёй на среду Эндо для получения изолированных колоний. Чашки с посевами поставить в термостат при температуре 37 °С.

4 день

Анализ посевов на среде Эндо

1. Просмотреть посевы на среде Эндо. Отобрать лактозоположительные колонии, сделать из них мазки и окрасить по Граму.

2. При наличии в мазках грамотрицательных палочек, с соответствующей культурой поставить тест на оксидазу. При отрицательной реакции произвести пересев культур в пробирки со средой Гисса с лактозой.

5 день

Определение коли-титра молока

1. Определить способность выделенных культур к сбраживанию лактозы. Сделать вывод о наличии в исследованной пробе молока колиформных бактерий.

2. Определить коли-титр молока по таблице 7.

Таблица 7

Стандартная таблица для определения коли-титра молока

Разведения молока				Коли-индекс	Коли-титр
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴		
-	-	-	-	< 9000	> 0,111
-	-	-	+	9000	0,111
-	-	+	-	9000	0,111
-	+	-	-	9500	0,105
-	-	+	+	18000	0,056
-	+	-	+	19000	0,053
-	+	+	-	22000	0,046
+	-	-	-	23000	0,043
-	+	+	+	28000	0,036
+	-	-	+	92000	0,011
+	-	+	-	94000	0,010
+	-	+	+	180000	0,006
+	+	-	-	230000	0,004
+	+	-	+	960000	0,001
+	+	+	+	2380000	0,0004
+	+	+	+	> 2380000	< 0,0004

Контрольные вопросы

1. Молоко как среда обитания микроорганизмов.
2. Ассоциации микроорганизмов молока и молочных продуктов.
3. Пути бактериального обсеменения молока.
4. Изменение качественного и количественного состава микроорганизмов в молоке при хранении.
5. Косвенное определение численности бактерий в молоке постановкой пробы на редуктазу.
6. Методы количественного определения микроорганизмов в молоке.
7. Определение коли-титра молока.
8. Определение кислотности молока по Тернеру.

Список рекомендуемой литературы

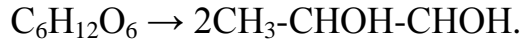
- Банникова Л.А., Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
- Клейменов Н.И. Микробиология молока. – М.: Колос, 2001. – 204 с.
- Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 255 с.
- Кугенев П.В. Молоко и молочные продукты. – М.: Россельхозиздат, 1985. – 80 с.
- Мюнх Г.Д., Заупе Х., Шрайтер М. Микробиология продуктов животного происхождения / Пер. с нем. – М.: Агропромиздат, 1985. – 592 с.
- Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 1. – 432 с.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.
- Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

ЗАДАЧА № 8

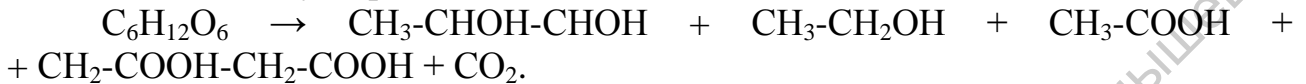
ВЫДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ПОЛУЧЕНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Естественными средами их обитания являются молоко, молочные продукты, желудочно-кишечный тракт человека и животных, поверхность растений, ризосфера, прикорневая зона. Основным свойством, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Молочнокислое брожение осуществляют бактерии, гетерогенные по морфологии, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*,

Pediococcus, *Streptococcus*, *Lactococcus*. Молочнокислые бактерии по характеру продуктов сбраживания гексоз (глюкозы, фруктозы, маннозы, галактозы), дисахаридов (лактозы, мальтозы, сахарозы) и полисахаридов (декстрина, крахмала) относят к гомоферментативным или гетероферментативным. Гомоферментативные бактерии образуют из сахаров в основном одну молочную кислоту:



Гетероферментативные бактерии образуют наряду с молочной кислотой значительные количества побочных продуктов: этанол, уксусную, янтарную кислоты, диоксид углерода:



Молочнокислые бактерии широко используются при изготовлении молочных продуктов (кефир, йогурт, масло, сыр и др.). Качество молочнокислых продуктов зависит от способности микроорганизмов, входящих в состав закваски, образовывать вкусовые и ароматические вещества (ацетоин, диацетил и др.). В состав закваски для изготовления йогурта входят *Lactobacillus bulgaricus* и *Lactococcus lactis*. Биойогурт получают при сквашивании молока бактериями *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*. При изготовлении кефира используют комплексную закваску на основе *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* и дрожжей.

Цель работы: из различных объектов выделить и идентифицировать молочнокислые бактерии; получить кисломолочные продукты с использованием выделенных штаммов.

Оборудование:

Посуда: пробирки, чашки Петри, пипетки, шпатели, эксикатор для создания микроаэрофильных условий, термометр.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар с добавлением 2 % сахарозы; среда МБ; капустный агар с мелом; агар MRS (прил. 1).

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Посев различных субстратов на различные питательные среды

1. Произвести разведение исследуемого продукта (квашеная капуста, натуральный фруктовый сок, силос и др.). Для этого 1 мл (1 г) субстрата поместить в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 1:10), произвести последующие разведения в пробирках до 10^{-4} .

2. Произвести посев из разведений 10^{-4} , 10^{-3} по 0,1 мл на плотные питательные среды (ГРМ-агар с 2 % сахарозы, среда МБ; капустный агар с мелом, агар MRS) в двух повторностях. Чашки с посевами поставить на инкубацию при температурах 28 °С и 37 °С. Посевы культивировать в микроаэрофильных условиях.

3 день

Анализ бактериологических посевов. Пересев выделенных культур молочнокислых бактерий на скошенный агар. Подготовка дифференциально-диагностических сред для идентификации выделенных культур молочнокислых бактерий

1. Сделать мазки из различных типов колоний, выросших на плотных питательных средах, окрасить по Граму. Описать культуральные и морфологические признаки выделенных штаммов молочнокислых бактерий.

2. Произвести посев выделенных культур на скошенный агар в 2 повторностях для культивирования микроорганизмов при температурах 28 °С и 37 °С. Посевы культивировать в микроаэрофильных условиях.

3. Подготовить биохимические тесты, необходимые для родовой и видовой идентификации выделенных культур (табл. 1).

*За сутки до проведения дальнейшей работы отсеять выделенные штаммы молочнокислых бактерий на скошенный агар.

4 день

Изучение биохимических свойств выделенных культур молочнокислых бактерий

1. Из культур, выросших на скошенном агаре, приготовить мазки, окрасить по Граму.

2. При наличии на скошенном агаре чистых культур произвести их посев на питательные среды для изучения биохимической активности.

3. Определить наличие каталазы, оксидазы, подвижности у исследуемых культур.

4. Молоко разлить в пробирки по 5 мл (количество пробирок соответствует количеству выделенных культур молочнокислых бактерий), дробно стерилизовать на водяной бане в течение трех дней.

5 день

Идентификация выделенных культур молочнокислых бактерий. Приготовление лабораторной закваски

1. По определителю бактерий Берджи (1980) идентифицировать выделенные культуры молочнокислых бактерий.

2. Отсеять выделенные культуры молочнокислых бактерий в пробирки с 5 мл молока для приготовления лабораторной закваски. Пробирки поставить в термостат при 37 °С.

6 день

Приготовление на основе выделенных культур молочнокислых бактерий кисломолочных продуктов

Молоко разлить в колбы по 100 мл, пастеризовать на водяной бане в течение 10 мин. Затем охладить до 40 °С и внести закваску в количестве 5 %. Колбы закрыть пробками, подписать, поставить в термостат при 37 °С.

7 д е н ь**Оценка органолептических свойств кисломолочных продуктов**

Провести органолептическую оценку кисломолочных продуктов. Сделать вывод о возможности использования выделенных культур молочнокислых бактерий в качестве бактериальных заквасок.

Контрольные вопросы

1. Общая характеристика молочнокислых бактерий.
2. Систематическое положение молочнокислых бактерий.
3. Гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение.
4. Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий.
5. Идентификация молочнокислых бактерий.
6. Культивирование молочнокислых бактерий в лабораторных условиях.
7. Питательные среды, используемые для выделения и культивирования молочнокислых бактерий.
8. Закваски для изготовления кисломолочных продуктов на основе лактобактерий.

Список рекомендуемой литературы

Банникова Л.А., Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 255 с.

Краткий определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – 446 с.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для вузов. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

ЗАДАЧА № 9**ПОИСК НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ
ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ**

Антибиотические свойства, проявляются у многих групп микроорганизмов. Микробы, продуцирующие антибиотики встречаются среди морской микрофлоры, выделяются из рек и озер, из растительных и животных остатков. Однако наибольшее количество микроорганизмов, обладающих антибиотическими свойствами, обнаружено в почвах. Большое число антибиотических веществ образуются различными группами микроорганизмов:

плесневыми грибами, бациллами и актиномицетами. Многие антибиотики названы по родовому или видовому названию их продуцентов: пенициллин и цефалоспорин названы по родам грибов *Penicillium* и *Cephalosporium*, стрептомицин по роду актиномицетов *Streptomyces*, полимиксин, виридин и гризеофульфин от видовых названий *Bacillus polymyxa*, *Trichoderma viridi* и *Penicillium griseofulvum*. Однако, большинство антибиотиков продуцируются актиномицетами.

В соответствии с современной систематикой бактерий к актиномицетам относят грамположительные эубактерии с молярным содержанием ГЦ-оснований больше 55 %, которые обнаруживают родство на основании данных анализа 16S рРНК и гибридизации ДНК. Эта группа объединяет организмы с разной морфологией: от кокков и палочек до форм, образующих ветвящиеся нити или формирующих развитый мицелий. В последнем случае при выращивании актиномицетов на твёрдых питательных средах различают субстратный и воздушный мицелий. Субстратный мицелий развивается в толще агаризованной среды, над поверхностью среды разрастаются тифы воздушного мицелия. Большинство актиномицетов размножается с помощью спор, образующихся в специальных органах спороношения — спорангиях. Последние различаются строением (длинные или короткие, прямые или спиралевидные с разным числом завитков) и расположением (последовательное, супротивное, мутовчатое и др.).

Результаты анализа 16S рРНК у актиномицетов, относящихся к разным родам, позволили разделить их на 7 групп, однако вопрос о присвоении таксономического ранга некоторым группам пока не ясен. В большинстве случаев эти группы совпадают с группами, предложенными в 9-м издании Определителя бактерий Берджи.

Основная экологическая ниша большинства актиномицетов – это хорошо аэрируемая зона почвы, где они ведут сапрофитный образ жизни. Количество актиномицетов в почве может достигать миллиона колониеобразующих единиц на 1 г сухой почвы. Некоторые представители актиномицетов являются важными компонентами нормальной микрофлоры кишечника, кожи и слизистых оболочек человека и животных. Однако помимо сапрофитов среди актиномицетов встречаются и патогенные формы.

Наибольший практический интерес актиномицеты представляют как продуценты антибиотиков. Этой группой микроорганизмов продуцировано около 80 % современных антибиотиков.

Цель работы: выделить из почвы культуры актиномицетов, познакомиться с их морфологией, изучить влияние продуцируемых ими антибиотиков на тест-культуры.

Оборудование:

Посуда: пробирки, чашки Петри, пипетки, шпатель.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; среда Гаузе и жидкая среда для актиномицетов (прил. 1).

1 день**Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред****2 день****Выделение актиномицетов из почвы**

1. Расплавить среду Гаузе для актиномицетов, разлить её в 6 чашек Петри.

2. Произвести разведение почвы: в пробирку с 5 мл стерильной воды внести 1 г почвы, размешать; 1 мл полученного разведения перенести во вторую пробирку с 5 мл воды, размешать; 1 мл из второй пробирки перенести в третью.

3. По 0,1 мл из каждого разведения почвы перенести в 3 чашки со средой Гаузе. Взвесить из каждого разведения растереть шпателем по двум чашкам методом истощающего посева; культивировать при 28 °С 5 – 7 дней.

3 день**Получение чистых культур актиномицетов, изучение их морфологии**

1. Отобрать 5 изолированных колоний актиномицетов, отсеять их на скошенную среду Гаузе. Культивировать в термостате при 28 °С.

2. Из тех же колоний приготовить мазки-отпечатки, зафиксировать их жидкостью Карнуа (прил.1), окрасить в течение 3 мин метиленовым синим по Леффлеру, промыть водой. Результаты микроскопирования зарисовать.

4 день**Выбор исследуемой культуры актиномицетов и отсев её для накопления биомассы**

1. Приготовить мазки из выросших культур актиномицетов. Окрасить по Граму, проверить чистоту культуры.

2. Приготовить смыв с одной из культур. По 1 мл полученной взвеси засеять в две колбы с 10 мл жидкой среды 2, по 0,1 мл засеять газоном в две чашки Петри с агаризованной средой Гаузе. Культивировать при 28 °С 5-7 дней.

*За сутки до проведения дальнейшей работы отсеять тест-культуры (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) на скошенный ГРМ-агар.

5 день**Определение влияния антибиотиков, продуцируемых выделенными штаммами актиномицетов, на тест-культуры**

1. Произвести смыв суточных тест-культур; по стандарту мутности на 10 ед. приготовить их взвеси в физиологическом растворе в концентрации 10^6 м.к./мл.

2. По 0,1 мл полученной взвеси газоном засеять на 2 чашки с ГРМ-агаром (по 2 чашки с каждой тест-культурой на группу); посевы подсушить при комнатной температуре в течение 10 – 15 минут.

3. Из газонов пяти актиномицетов (выделенных разными исследователями) стерильным инструментом вырезать агаровые блочки, наложить их на засеянные газоны тестовых микроорганизмов культурой актиномицетов вверх (использовать по одной чашке с газоном каждой тест-культуры).

4. Из взвеси актиномицетов в жидкой среде для актиномицетов с помощью насоса Камовского приготовить фильтраты.

5. Из второй чашки с газоном исследуемого возбудителя стерильным инструментом вырезать блочки (5 штук), их место заполнить расплавленным стерильным агаром. На участки стерильного агара нанести по 1 капле фильтрата различных актиномицетов. Посевы культивировать при 37 °С.

6 д е н ь

Определение влияния антибиотиков, продуцируемых выделенными штаммами актиномицетов, на тест-культуры

Просмотреть газоны с блочками актиномицетов и их фильтратами, отметить зоны подавления роста тест-культур. Сделать вывод об эффективности воздействия антибиотиков, продуцируемых выделенным актиномицетами, на различные тестовые микроорганизмы.

Контрольные вопросы

1. Особенности систематического положения актиномицетов.
2. Культуральные и морфологические свойства актиномицетов.
3. Основные особенности размножения актиномицетов.
4. Распространение актиномицетов в природе.
5. Основные антибиотики, продуцируемые актиномицетами.
6. Методы выделения актиномицетов. Питательные среды, используемые для культивирования актиномицетов.
7. Методы определения действия антибиотиков, продуцируемых актиномицетами, на другие микроорганизмы.

Список рекомендуемой литературы

Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Изд. центр «Академия», 2003. – С. 180 – 183.

Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 2. – 368 с.

Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – С. 200 – 201, 354 – 360.

ЗАДАЧА № 10

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ БИОУДОБРЕНИЙ

Известно, что урожайность сельскохозяйственных культур напрямую зависит наличия в почве азотистых веществ. В связи с этим, в последние годы в почву активно вносились минеральные нитратные и аммонийные химические удобрения. Да, эти технологии действительно помогали получить высокие урожаи, но они привели и к накоплению химикатов в почве, сдвигу микробного равновесия и снижению естественного плодородия почвы. Доказано, что плодородие почвы напрямую зависит от течения микробиологических процессов в почве, среди которых особое место занимают микроорганизмы, участвующие в обогащении почвы азотом. Именно они и используются в основе биоудобрений. В современных условиях применение биоудобрений получает все более широкое распространение в сельском хозяйстве. Уже активно используются такие удобрения как «Ризоторфин» на основе бактерий *Rhizobium japonicum*; «Агрофил» - на основе *Agrobacterium radiobacter*; «Нитрагин» и «Ризоторфин» - на основе клубеньковых бактерий.

В природе цикл азота состоит из нескольких этапов, основную роль в которых играют микроорганизмы. При этом только бактерии могут выполнять все реакции цикла. В данном круговороте участвует молекулярный азот и его связанные соединения – минеральные и органические.

Способность к биологическому связыванию молекулярного азота присуща только прокариотам. Азотфиксаторы известны среди 100 родов бактерий, принадлежащих к самым разнообразным физиологическим группам. Все они диазотрофы, так как могут использовать для питания и молекулярный, и минеральный азот. Ежегодно на поверхности суши бактерии фиксируют до 200 млн тонн азота и от 30 до 190 млн тонн – в водных экосистемах.

В зависимости от взаимоотношений с растениями различают симбиотические, ассоциативные и свободноживущие азотфиксаторы.

Симбиотические азотфиксаторы образуют симбиоз с растениями. Более 1300 видов бобовых растений и 200 видов небобовых древесных и кустарниковых пород (ольха, облепиха, мох и другие) имеют клубеньки на корнях. Клубеньковые бактерии относятся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и другим. Внедрившись в ткань корня, эти бактерии распространяются обычно в виде инфекционных нитей – колоний размножившихся клеток бактерий. В зрелой клубеньковой ткани бактериальные клетки превращаются в бактериоиды – грушевидные, сферические или ветвистые образования. Зона клубенька с клетками как бактериальной, так и бактериоидной формы получила название бактериоидной. На питательных средах клетки ризобий – подвижные, не образующие спор граммотрицательные палочки. Среди них встречаются и кокковидные клетки. В старых культурах клетки крупнее, палочковидные, неподвижные, изредка встречаются Т-образные бактериоидные формы. По скорости роста клубеньковые бактерии делят на медленно растущие, например *Bradyrhizobium japonicum* у люпина, сои, и быстрорастущие – у гороха, клевера и др.

Ассоциативные азотфиксаторы – это ризосферные (корневые) и филлосферные (листовые) бактерии, формирующие ассоциации с различными видами небобовых растений. К настоящему времени известно более 200 видов (24 рода) ассоциативных diaзотрофов: *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Xanthobacter* и др. Для них характерна колонизация корней без образования выраженных морфологических структур, но с положительным эффектом на продуктивность растения. Наибольший интерес среди ассоциативных азотфиксаторов представляют выявляемые в больших количествах на корнях трав, особенно злаков, бактерии из рода *Azospirillum* с высокой азотфиксирующей активностью. Азоспириллы – это утолщенные вибрионы или палочки с заостренными концами, шириной около 1 мкм, подвижные за счет одного или нескольких жгутиков в молодом возрасте и теряющие подвижность при переходе в состояние цист в старых культурах. Для проявления их азотфиксирующих способностей необходимо пониженное содержание кислорода в среде.

Свободноживущие почвенные азотфиксаторы обитают независимо от присутствия растения. Наибольший интерес среди них представляют виды родов *Azotobacter*, *Clostridium* и *Bacillus*.

Бактерии рода *Azotobacter* относятся к свободноживущим в почве микроорганизмам, способным фиксировать молекулярный азот. Известно несколько видов этого рода, различающихся между собой размерами и формой клеток, а также пигментацией колоний. Колонии азотобактера темно-коричневого, почти черного цвета (*A. chroococcum*), или с зеленым флуоресцирующим пигментом (*A. agile*, *A. vinelandii*), или бесцветные (род *Beijerinckia*). Клетки азотобактера плеоморфные – от палочковидных в молодой культуре (12 – 24 часа) до кокковидных в старых культурах. Располагаются одиночно, попарно, часто окружены слизистой капсулой.

Все виды азотобактера являются аэробами. В качестве источника азота он может ассимилировать соли аммония, нитраты, нитриты, аминокислоты. При отсутствии связанных форм азота он фиксирует молекулярный азот. Из источников углеродного питания азотобактер способен использовать моно- и дисахариды, некоторые полисахариды, многие спирты, органические кислоты. Азотобактер требователен к субстрату, не выносит кислой реакции среды и более влаголюбив, чем другие почвенные бактерии.

Азотфиксация – это уникальный процесс, присущий только прокариотическим микроорганизмам. Под азотфиксацией понимают способность некоторых групп бактерий и архей к энзиматическому восстановлению атмосферного азота до аммония (с образованием водорода), который затем включается в клеточное вещество. Несмотря на разнообразие микроорганизмов, осуществляющих азотфиксацию, комплекс нитрогеназы одинаков у аэробов и анаэробов. Один из ее отличительных признаков – чрезвычайная чувствительность к наличию кислорода. Поэтому у аэробных микроорганизмов существуют специальные приспособления для защиты нитрогеназы от кислорода – слизистая капсула, толстая клеточная стенка, особая конформация и др. Факультативные анаэробы фиксируют азот только в анаэробных условиях.

Продуктивность азотфиксации зависит от многих причин, в частности от возраста культуры, вида, рН среды, присутствия микроэлементов и т.д. В основном азотфиксация складывается из соотношения между использованным углеродом и накопленным азотом. Продуктивность азотфиксации можно повысить путем введения в питательную среду различных веществ – микроэлементов, витаминов и т. п. Практическое применение азотфиксирующих микроорганизмов в деятельности человека заключается в основном во внесении их в почву или на корни и семена растений. Бактерии рода *Azotobacter* улучшают азотное питание растений, а также продуцируют биологически активные вещества (биотин, гетероауксин, гиббереллин, пиридоксин и др.), которые стимулируют рост растений.

Цель работы: выделить из почвы штамм свободноживущей азотфиксирующей бактерии, идентифицировать его; изучить азотфиксирующую активность выделенного штамма.

Оборудование:

Посуда: чашки Петри, колбы на 250 мл, пробирки, пипетки.

Питательные среды: физиологический раствор; агаризованная среда Эшби; жидкая среда Эшби; жидкая среда Эшби с добавлением соли молибдена или бора (прил. 1).

Оборудование: эбулиостат, колбы Кьельдаля, отгонная колба, обратный холодильник, дефлегматор, электроплитка, 2 бюретки.

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Посев почвы на агаризованную среду Эшби

1. Разлить среду Эшби в 4 чашки Петри.
2. На чашки Петри со средой нанести 25 мелких комочков почвы (садовая земля, почва из цветочных горшков, клумбы и т.д.) по методу Виноградского (пять рядов по пять комочков). Чашки в перевернутом виде поместить в термостат при 28 °С на 3 – 5 суток.

3 д е н ь

Получение чистой культуры азотфиксаторов

При обнаружении роста азотфиксирующих бактерий вокруг комочков почвы произвести рассев на 2 чашки Петри со средой Эшби. Чашки поставить в термостат при температуре 28 °С на 3 – 4 суток.

4 д е н ь

Получение чистой культуры азотфиксаторов. Подготовка питательных сред для идентификации выделенного штамма

1. Отобрать одну чистую культуру азотфиксатора для дальнейших исследований.

2. На чашках с рассевом азотфиксаторов выбрать изолированные колонии, охарактеризовать их культуральные свойства. Приготовить мазки из колоний, окрасить по Граму. Описать морфологические свойства культур.

3. Выбрать одну чистую культуру азотфиксатора и провести ее пересев в пробирки со скошенной средой Эшби (4 – 5 пробирок) для накопления биомассы.

4. Учитывая морфологию отобранной для идентификации культуры, подготовить среды для изучения ее биохимических свойств (см. табл. 1).

5 день

Изучение биохимических свойств отобранного для идентификации штамма

1. Из культур, выросших на скошенной среде, приготовить мазки, окрасить по Граму. При наличии чистых культур произвести их посев на дифференциально-диагностические среды для изучения биохимической активности.

2. Приготовить жидкую безазотистую среду Эшби – 2 колбы по 100 мл. В одну из колб добавить 0,01 % соли молибдена или бора.

3. Подготовить к стерилизации 3 пробирки с физиологическим раствором (по 5 мл) и 2 пипетки на 10 мл.

6 день

Идентификация штаммов

1. По определителю бактерий Берджи идентифицировать исследуемые штаммы.

2. Произвести посев густой взвеси идентифицированных азотфиксаторов на жидкую безазотистую среду Эшби с солями молибдена или бора в колбы. Посевы инкубировать при 28 °С в течение 5 – 6 дней.

3. Приготовить растворы 1 и 2 для определения количества остаточного сахара эбулиостатическим методом.

Состав раствора 1: CuSO_4 – 10 г, метиленовая синь – 0,04 г, дистиллированная вода – 1 л.

Состав раствора 2: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий виннокислый, сегнетова соль) – 50 г, NaOH – 74 г, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (калий железосинеродистый) – 4 г, дистиллированная вода – 1 л.

7 день

Изучение азотфиксирующей активности идентифицированных азотфиксаторов в зависимости от условий их культивирования. Определение количества остаточного сахара эбулиостатическим методом. Определение общего азота по методу Кьельдаля

Эбулиостатический метод определения сахаров основан на реакции окисления редуцирующих веществ меднощелочным раствором. Это сложная реакция, она состоит из большого количества реакций, идущих одновременно. Схематически – это изменение меди, которая из двухвалентной переходит в одновалентную, образуя Cu_2O . Для того чтобы Cu_2O не выпадал в осадок, к

меднощелочному раствору прибавлена желтая кровяная соль – калий железосинеродистый (гидрат $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$), которая образует прочное, хорошо растворимое соединение с одновалентной медью.

В эбулиостатическом методе применен принцип прямого титрования. Горячий меднощелочной раствор титруется раствором сахара (в данном случае – это культуральная жидкость) в специальном приборе – эбулиостате. Прибор состоит из внешнего сосуда (колбы) и внутреннего сосуда – широкой пробирки, суженной кверху и имеющей впаянную трубку. Для отвода пара предусмотрено отверстие с резиновой трубкой. В данном приборе анализ проходит в токе водяного пара без доступа воздуха к поверхности реагирующей жидкости, что достигается паровой рубашкой и пропусканием пара через реагирующую жидкость. Такой способ обогрева позволяет проводить анализ в токе водяного пара при хорошем перемешивании всех реагирующих жидкостей, при отсутствии местных перегревов и изменения объема реагирующих жидкостей за счет конденсации пара. Обеспечивается также быстрый нагрев жидкости в эбулиостате до $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и сохранение этой температуры в течение всего анализа. Индикатором в ходе данного анализа является метиленовая синь, которая в окислительной среде имеет синюю окраску, а в восстановительной среде – она бесцветная. По изменению окраски метиленовой сини можно судить об окончании титрования меднощелочного раствора раствором сахара, т.е. о наступлении того момента, когда вся окисленная медь превратится в закисную (окислительная среда станет восстановительной).

1. Установить титр медного купороса по глюкозе:

- вначале необходимо приготовить 0,09 %-ный водный раствор глюкозы;
- далее провести титрование смеси реактивов 1 и 2 (по 2,5 мл) раствором глюкозы и определить количество миллилитров раствора, идущего на титрование;
- зная концентрацию раствора глюкозы и его количество (мл), идущее на титрование, вычисляют количество (мг) глюкозы, которое идет на восстановление меди, содержащейся в 5 мл смеси растворов. Условно эта величина называется титром.

Пример расчета. Был приготовлен 0,09 %-ный раствор глюкозы. На титрование 5 мл смеси растворов пошло 6,3 мл раствора глюкозы. 1 мл этого раствора содержит 0,9 мг глюкозы. Следовательно, титр испытуемого раствора вычисляется следующим образом:

$$T = 0,9 \times 6,3 = 5,67 \text{ мг глюкозы.}$$

В качестве анализируемого раствора используется культура азотфиксаторов, выросшая на жидкой безазотистой среде Эшби:

- во внешний сосуд эбулиостата наливают воду (меньше половины колбы) и ставят на плитку. Когда вода закипит, во внутренний сосуд последовательно разными пипетками наливают по 2,5 мл первого и второго реактива;
- как только смесь растворов закипит, начинают по каплям добавлять анализируемый раствор;
- титрование заканчивают в момент изменения цвета окраски реагирующих веществ – от синего до бесцветного (или желтого). Резкое

изменение цвета окраски указывает на окончание титрования.

Пример расчета.

Вычисление концентрации редуцирующих веществ производят по формуле:

$$X = T \times P \times 100 / a \times 1000,$$

где T – титр CuSO_4 по глюкозе;

P – разведение исследуемого раствора (проводят по мере необходимости);

a – количество мл исследуемого раствора, пошедшее на титрование;

X – концентрация сахара (в %).

2. Провести титрование анализируемого раствора.

3. Провести определение общего азота по Кьельдалю.

Метод основан на том, что азот, находящийся в исследуемом материале, при нагревании с концентрированной серной кислотой отщепляется в виде аммиака с образованием серноокислого аммония. Из последнего аммиак вытесняется концентрированной щелочью в титрованный раствор серной кислоты. По количеству нейтрализованной кислоты вычисляют количество азота. Для ускорения реакции разложения органического вещества при сжигании прибавляют катализаторы – сернокислую медь (CuSO_4) и сернокислый калий (K_2SO_4). Определение общего азота по Кьельдалю проводится в 2 этапа: 1 этап – сжигание, 2 этап – отгонка аммиака.

Сжигание проводится под тягой в тугоплавкой длинногорлой колбе Кьельдаля.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4 ; CuSO_4 ; K_2SO_4 ; 0,1 н H_2SO_4 (готовится из фиксанала); 0,1 н NaOH ; индикатор – метилрот.

- 10 мл исследуемой культуры помещается в колбу Кьельдаля и заливается 30 мл концентрированной H_2SO_4 . Перед сжиганием добавляется 250 мг CuSO_4 и 750 мг K_2SO_4 , а также 1 мл хлорной кислоты в качестве катализатора процесса сжигания;

- после прибавления всех реактивов содержимое колбы перемешивают круговыми движениями. Горло колбы прикрывают маленькой воронкой;

- далее колбу помещают на плитку в наклонном положении. Сжигание продолжают до полного просветления жидкости, исчезновения бурого цвета и появления желтовато-зеленой окраски. Нагревание следует продолжать еще какое-то время после просветления жидкости, так как некоторые азотистые соединения нуждаются в более длительном нагревании.

*Приготовить 33 %-ный раствор NaOH (0,5 л) для дальнейшей работы.

8 д е н ь

Изучение азотфиксирующей активности идентифицированных азотфиксаторов в зависимости от условий их культивирования. Определение общего азота по Кьельдалю

1. После сжигания содержимое колбы Кьельдаля переносят в отгонную круглую плоскодонную колбу емкостью 1 л. Колбу Кьельдаля ополаскивают несколько раз дистиллированной водой, которую также сливают в отгонную

колбу. Общий объем воды в колбе не должен превышать 100 – 150 мл.

2. После подготовки отгонной аппаратуры (рис. 2) в отгонную колбу добавляют сплав Декарда (3 – 5 гранул) для равномерного кипения. Далее в колбу осторожно, по стенке, приливают 70 – 100 мл 33 %-ный раствора щелочи. Щелочь стекает на дно, не смешиваясь с жидкостью, что устраняет потери аммиака. Затем колбу быстро закрывают резиновой пробкой и ставят на электроплитку. В это время конец трубки холодильника должен быть опущен в приемную колбу или стакан с 40 мл 0,1 н H_2SO_4 , которая отмеряется бюреткой. Содержимое колбы должно кипеть 5 – 7 мин. Во время отгона нужно поддерживать равномерное кипение, чтобы раствор серной кислоты не втягивался через холодильник в отгонную колбу.

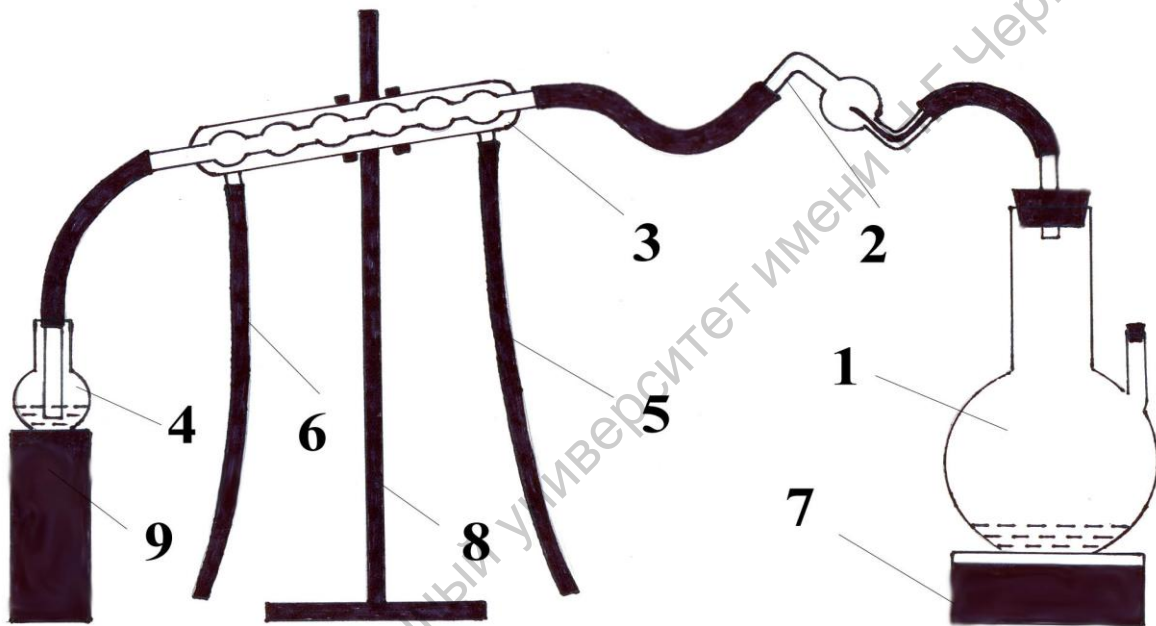


Рис. 2. Отгонная аппаратура для определения общего азота по Кьельдалю:

1 – отгонная колба; 2 – дефлегматор; 3 – обратный холодильник; 4 – приемная колба; 5 – шланг для слива воды; 6 – шланг для залива воды; 7 – электрическая плитка; 8 – химический штатив; 9 – подставка для приемной колбы.

3. После окончания времени отгона в приемный стакан с 0,1 н серной кислотой добавляют несколько капель метилрота. Кислоту титруют 0,1 н щелочью из бюретки в присутствии индикатора метилрота до светло-апельсинового цвета. При расчете необходимо учитывать и вносить поправки для каждой партии употребляемых реактивов.

4. При расчете азота количество связанной аммиаком серной кислоты вычисляется по разности между взятым ее количеством и количеством, определенным при помощи титрования. Находят соотношение между 0,1 н H_2SO_4 и 0,1 н $NaOH$. Для этого берут 10 мл 0,1 н серной кислоты, добавляют несколько капель индикатора метилрота и титруют 0,1 н щелочью до лимонно-желтого цвета. Например, на 10 мл серной кислоты пошло 9,6 мл 0,1 н щелочи. Тогда поправка к щелочи будет равна: $K = 10 / 9,6 = 1,0416$. На эту поправку (K) умножают количество щелочи, пошедшее на титрование опытных проб.

Пример расчета.

- допустим, что на титрование 40 мл 0,1 н H_2SO_4 пошло 38 мл 0,1 н NaOH, тогда $38 \times 1,0416 = 39,580$;

- рассчитываем, сколько кислоты было связано аммиаком: $40 - 39,5808 = 0,42$ мл;

- известно, что 1 мл 0,1 н серной кислоты соответствует 1,4 мг азота. Тогда количество азота во взятой пробе будет равно: $0,42 \times 1,4 = 0,588$ мг;

- содержание азота вычисляется на 1 г потребленного микроорганизмами сахара;

- если микроорганизмы в процессе жизнедеятельности утилизировали 0,4 г сахара и при этом образовалось 0,02 г азота, то количество азота на 1 г израсходованного сахара вычисляется по пропорции:

$$0,4 - 0,02$$

$$1,0 - X$$

$$X = 0,02 / 0,4 = 0,05 \text{ г.}$$

5. По полученным результатам необходимо сделать вывод об азотфиксирующей активности исследуемых штаммов азотфиксаторов в зависимости от условий культивирования.

Контрольные вопросы

1. Микроорганизмы-азотфиксаторы, их морфологические и физиолого-биохимические особенности.
2. Биохимия процесса фиксации азота свободноживущими бактериями.
3. Особенности фиксации азота симбиотическими бактериями.
4. Основные методы изучения процесса азотфиксации.
5. Систематическое положение азотобактера и других азотфиксаторов, основные виды, их биологическая характеристика.
6. Морфологические и культуральные свойства азотобактера.
7. Методы выявления капсулы. Роль капсулы у патогенных и непатогенных микроорганизмов.
8. Основные источники C и N, используемые азотфиксаторами.
9. Распространение азотфиксаторов в природе, приуроченность к различным типам почв.
10. Основные бактериальные удобрения и области их применения.
11. Методика выделения культур азотфиксаторов из почвы, используемые питательные среды.
12. Эбулиостатический метод определения сахаров, используемые реактивы и материалы, ход анализа.
13. Метод определения азота по Кьельдалю, основные этапы, используемые реактивы и материалы.
14. Принцип расчета азотфиксирующей активности, единицы измерения.

Список рекомендуемой литературы

Биотехнология / Под ред. Н.С. Егорова и В.Д. Самуилова. – М.: Высш. шк., 1987. – Т. 6. – 142 с.

Воробьева Л.И. Техническая микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 168 с.

Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 580 с.

Краткий определитель бактерий Берджи / Под ред Д. Хоулта и др. – М.: Мир, 1980. – 495 с.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 1. – 432 с.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 2. – 368 с.

Петерсон А.М., Чиров П.А. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. – 24 с.

Пивоваров Ю.П., Кролик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация). – М.: ИКАР, 2000. – 268 с.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высших учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практ. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 215 с.

Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1979. – 216 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир. – 1987. – 566 с.

ЗАДАЧА № 11

**ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ,
УСТОЙЧИВЫХ К КСЕНОБИОТИКАМ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ
ДЕСТРУКТИВНЫХ СВОЙСТВ**

Ксенобиотики (от греч. xenos - чужой и bios - жизнь) - чужеродные для организмов соединения (промышленные загрязнения, пестициды, препараты бытовой химии, лекарственные средства и т. п.). Попадая в окружающую среду в значительных количествах, ксенобиотики могут воздействовать на генетический аппарат организмов, вызывать их гибель, нарушать равновесие природных процессов в биосфере. Изучение превращений ксенобиотиков в организмах, путей их детоксикации и деградации важно для организации санитарно-гигиенических мероприятий, мер по охране природы.

В процессе круговорота ксенобиотиков в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. В связи с ростом городов и развитием промышленности возникли серьезные экологические проблемы: загрязнение водоемов, накопление ядовитых веществ, в том числе канцерогенных, бытового

мусора и отходов, загрязнение воздуха.

Интенсивное ведение сельскохозяйственного производства предполагает использование химических средств для борьбы с вредителями возделываемых растений. Эти средства, применяемые для борьбы с насекомыми, клещами возбудителями грибковых заболеваний растений и животных, с сорной растительностью и другими объектами живой природы, называют общим термином «пестициды». Пестициды обладают высокими токсическими свойствами избирательно. Одни токсичны для насекомых, другие для грибов, третьи для сорной растительности. Но нередко эти вещества оказываются токсичными и для теплокровных животных. Известно, что заражение почв ядохимикатами происходит не только при непосредственном производстве сельхозпродукции, но и в результате хранения или захоронения неликвидных пестицидов, в настоящее время запрещенных к применению.

Продолжительность сохранения и разложения пестицидов в почве зависит как от их химических и физических свойств, дозы и формы применения препарата, так и от типа почвы, ее влажности, температуры и физических свойств, состава почвенной микрофлоры, видового состава произрастающих растений и особенностей обработки почвы.

В борьбе с различными вредителями сельскохозяйственных культур растений, паразитами животных и человека использовали и используют широкий спектр пестицидов: хлорированные углеводороды (ГХЦГ, ДДТ), фосфорорганические препараты (хлорофос, метафос и др.), растительные вещества (пиретрум, никотин и др.), препараты кишечного действия (бура, бутацион) и другие. Токсичность и скорость действия препаратов зависит от формы применения. Применяют их в твердом, жидком и газообразном виде (растворы, аэрозоли, пасты, гранулы). Важно, что при всех назначениях и способах использования пестициды почти всегда попадают в почву, где продолжают свое действие на ее основных обитателей: бактерии, грибы, простейшие, а также беспозвоночные животные. Более того, многие из них способны накапливаться во внешней среде, особенно в почве, а также в органах диких и домашних животных, оказывая негативное воздействие на ряд жизненных функций организма. Поэтому их применение обуславливает непрерывный поиск новых эффективных и экологически безопасных препаратов. В связи с этим новые синтезированные препараты проходят всестороннее изучение на различных объектах живой природы.

В тоже время многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказываются устойчивыми к разложению микроорганизмами, что требует разработки более усовершенствованных технологий. Так для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные приборные устройства.

Многие из созданных человеком химических веществ проявляют биологическую активность: обладают мутагенными и канцерогенными свойствами, нарушают структуру клетки.

Веществами, обладающими опасным для человека действием являются:

1. проявляющие канцерогенный, мутагенный эффект: хлорорганические (ДДТ,

полихлорпирен, полихлоркамфен, гексахлорбутадиен); производные дитиокарбаминовой кислоты (цирам, цинеб, ТМГД); производные карбаминовой кислоты (беномил, пиримор, бетанал); производные мочевины (каторан); другие (хлорофос, фталофос, дихлофос, гетерофос, каптан, базудин, фолфет и др.).

2. вызывающие резистентность у вредителей патогенов и сорняков: инсектициды и акарициды (ДДТ, токсафен, эндрин, малатион, фосмет, арамит); фунгициды (медный купорос, каптан, агрозан, Додин, фталан, родан, фигон).

Некоторые загрязняющие биосферу вещества по своему происхождению являются природными соединениями. Например, компонент древесины лигнин, образующийся в значительных количествах как отход целлюлозно-бумажной промышленности. К числу загрязняющих биосферу веществ природного происхождения принадлежат и многие ароматические и галогенсодержащие углеводороды.

Устойчивость многих ксенобиотиков в биосфере довольно высока. Например, ДДТ не исчезает из почвы до 30 лет, альдрин и гептахлор – до 15 лет, диэльдрин – до 25 лет. Некоторые ксенобиотики, подвергаясь распаду или трансформации, могут образовывать более устойчивые или токсичные продукты. Среди ксенобиотиков, вносимых человеком в биосферу, немалая часть относится к производным нафталина и салициловой кислоты. В превращении этих соединений участвует большое число микробных ферментов. Поэтому большое внимание уделяется влиянию пестицидов на почвенные микроорганизмы.

Необходимость исследования действия пестицидов на почвенную микрофлору обусловлена важнейшей ролью микроорганизмов в самоочищении почвы от ксенобиотиков, создании почвенного плодородия и оптимизации условий вегетации растений. Большую значимость приобретают разработки микробиологического способа очистки почвы от пестицидов. В связи с этим ведутся поиски и конструирование штаммов микробов – деструкторов пестицидов и интродукция их в природные экосистемы. Эти исследования необходимы не только для оценки новых препаратов, но и для разработки эффективных методов детоксикации и очищения почвы от продуктов разложения препаратов массового и длительного применения.

Цель работы: изучить влияние пестицидов на численность микроорганизмов в почве, выявить штаммы, проявившие стимулирование роста в присутствии пестицида и способные усваивать углерод из препарата и определить их деструктивную активность.

Оборудование:

Посуда и приборы: трехмиллиметровое сито, фарфоровая ступка с пестиком и резиновой насадкой, колбы Эрленмейера на 250 мл, пробирки, пипетки, шпатели, чашки Петри, сосуды для почвы, пестицид, качалка Шуттеля, термостат, концентрационный фотоэлектроколориметр (ФЭК, КФК-2), центрифуга, стандарт мутности на 5 единиц.

Питательные среды и растворы: физиологический раствор, ГРМ-агар, среды Гаузе, Сабуро, Эшби, М9 или СМС.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды, питательных сред и внесение пестицида в почву

Почва для экспериментальных исследований берется заранее из пахотного горизонта на глубине 3-20 см не менее 5 проб массой по 0.5 кг по принципу «конверта». В стерильном пакете пробы тщательно перемешивают для получения общего образца массой 2,5 кг. В лаборатории почву необходимо перебрать, удалить крупные частицы (камни, корни, листья), просеять через сито и определить влагоёмкость. Подготовленную таким образом почву разделить на 4 пробы по 0,5 кг, поместить в пластмассовые сосуды и использовать для постановки экспериментов.

Пестицид (порошок, гранулы, паста и пр.) развести в той жидкости, в которой достигается лучшая растворимость. Объем растворителя для всех доз пестицида должен быть одинаковым. Использовать три дозы препарата: производственную концентрацию пестицида (ПКП), превышающие производственную концентрацию в 10 раз (10 ПКП) и в 100 раз (100 ПКП). Полученные дозы препарата внести в 3 сосуда с почвой, в четвертый (контроль) – пестицид не вносить. В контрольный сосуд внести только растворитель (без пестицида) в объеме одной дозы. На протяжении всего опыта все 4 сосуда должны находиться в одинаковых условиях: температура 28⁰С, влажность – 60%.

2 день

Подготовка почвы к исследованию и приготовление последовательных разведений суспензии.

Работу провести после внесения пестицида в почву через 5, 15 и 30 суток. Для этого из каждого сосуда взять по 1 г почвы. Навеску почвы поместить в стерильную фарфоровую ступку и растереть пестиком с резиновой насадкой, добиваясь разрушения почвенных агрегатов и десорбции микробных клеток. Затем растертую массу увлажнить 1 мл воды, взятой из специально подготовленной стерильной колбы на 250 мл, содержащей 100 мл воды или 0.85 % физиологического раствора. Увлажненную в ступке почву, растирая в течение 5 мин, довести до пастообразного состояния и смыть стерильной водой из той же колбы, перенося весь объем (100 мл) воды со смесью в другую (пустую) подготовленную стерильную колбу такого же объема (250 мл). Таким способом приготовить навески, взятые из всех четырех сосудов с пробами почвы.

В результате смешивания 1 г почвы со 100 мл воды получить основные разведения (1:100) суспензий. Колбы с суспензиями установить на качалку Шуттеля для 15 минутного встряхивания, затем отстоять в течение 30 с и использовать для последующих разведений. Для этого из основного разведения (1:100) стерильной пипеткой перенести 1 мл суспензии в стерильную пробирку с 9 мл воды. Полученное разведение (1:1000) тщательно перемешать и из него 1 мл перенести в последующую пробирку по приведенной схеме:

1г почвы + 100 мл физ.раствора = разведение 1:100 (10^{-2}),

1 мл разведения 1:100 + 9 мл физ.раствора = разведение 1:1000 (10^{-3}),

1 мл разведения 1:1000 + 9 мл физ.раствора = разведение 1:10000 (10^{-4}),

1 мл разведения 1:10000 + 9 мл физ.раствора = разведение 1:100000 (10^{-5}),

1 мл разведения 1:100000 + 9 мл физ.раствора = разведение 1:1000000 (10^{-6}).

3 д е н ь

Выделение микроорганизмов из почвы и получение чистых культур

Полученные разведения почвы высеять на три среды: мясо-пептонный агар (МПА), Среду Гаузе и сусло агар (СА) или Сабуро (прил.1) - для выделения трех систематико-физиологических групп микробов: актиномицетов, гетеротрофных бактерий и плесневых грибов. Актиномицеты и грибы выявлять поверхностным методом, высевая по 0.1 мл суспензии из разведения 10^{-2} в чашки Петри с разлитым агаром Сабуро или сусло, а из разведения 10^{-3} на среду Гаузе.

После высева материал стерильным шпателем растереть по поверхности агара. Посев материала из каждого разведения осуществлять на три чашки. Перед посевом все чашки Петри с агаром подсушить в термостате.

Гетеротрофные бактерии выявлять глубинным методом посева суспензии. Для этого 1 мл взвеси из разведения 10^{-5} вылить на дно стерильной чашки Петри и затем залить 15-20 мл расплавленным и остуженным до 45°C МПА. Легкими круговыми движениями среду с посевным материалом аккуратно перемешать. После застывания МПА посева поместить в термостат для культивирования.

Важным условием дальнейшей микробиологической работы является изолирование отдельных видов бактерий и получение чистых культур, т.е. таких культур, которые содержат один вид какого-либо микроорганизма. Известно много методов получения чистых культур. Широко используются: метод последовательных разведений или фракционный метод Пастера, пластинчатых разводов по Коху, изолирование отдельных клеток по способу Дригальского, а также высев на различные дифференциальные среды.

4 д е н ь

Провести анализ численности микроорганизмов в почве с различными дозами пестицида

Количественные показатели, полученные при подсчете колоний микробов, занести в журнал, анализируя и формируя таблицы для каждой систематико-физиологической группы.

Количество микробов, содержащееся в одном грамме контрольной почвы, следует принять за 100%, а численность микроорганизмов в почве с пестицидом отражать в процентах по отношению к контролю.

Примерное оформление результатов приведено в таблице 8.

Таблица 8

**Влияние различных доз пестицида на численность
гетеротрофных бактерий**

Доза препарата, мг/кг	Экспозиция, сут							
	0		5		15		30	
	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%	Число м.к. в 1 г почвы ($\times 10^n$)	%
1	13	118	23	127	28	127	25	108
10	11	100	30	166	38	172	32	139
100	12	109	32	177	30	136	25	108
Контроль	11	100	18	100	22	100	23	100

5 день

Определение чувствительности чистых культур микроорганизмов к пестицидам

Пестициды, как правило, оказывают синергетическое или антибактериальное действие при контакте с микроорганизмами. Явление синергизма может объясняться использованием микроорганизмами отдельных элементов пестицида, в частности углерода, для своего питания. Антибактериальное действие – воздействие препарата на физиологические функции микробов, в результате которого происходит снижение биологической активности и даже гибель их.

1. Внесение пестицида в среды.

Для каждой систематико-физиологической группы микроорганизмов (актиномицеты, гетеротрофные бактерии, грибы) разлить по две колбы соответствующих сред: Гаузе, МПА, Сабуро. Стерилизовать в автоклаве: МПА - при 1 атм в течение 20 мин, Гаузе и Сабуро – при 0,5 атм 30 мин. После стерилизации питательные среды охладить до 45⁰С и в колбы внести пестицид с таким расчетом, чтобы конечная концентрация препарата в среде составила 0,003%. Сухие препараты предварительно растворить в ацетоне, спирте или другом растворителе и добавить такой же объем растворителя в контрольные колбы (без пестицида). Затем среды хорошо перемешать, разлить в стерильные чашки Петри и оставить при комнатной температуре до полного застывания. Поверхность агаризованных сред перед посевом подсушить для удаления конденсатной воды. Для этого чашки поместить в термостат крышками вниз и оставить на сутки. После подсушивания среды использовать в работе.

2. Высев микроорганизмов на питательные среды, содержащие пестицид

Для изучения чувствительности к пестицидам полученные чистые культуры микробов засеять в чашки Петри с питательными средами, содержащими тот или иной препарат. Для этого обычно используют суточные

культуры гетеротрофных бактерий, 3-5-суточные культуры актиномицетов и грибов. Гетеротрофные бактерии выращивают на скошенном МПА, актиномицеты - на среде Гаузе, грибы - на Сабуро или сусло агаре. Смывы и взвеси микробов готовить с помощью стерильного физиологического раствора. Содержание микробных клеток определить по оптическому стандарту мутности (ГНКИ). Обычно используют стандарт (5 ед.), содержащий 500 млн м.к. в 1 мл.

Посев взвесей исследуемых культур проводить методом отпечатков или уколом на поверхность питательной среды, содержащей пестицид (опыт) и без него (контроль). Высев каждой культуры в опыте и контроле осуществлять трехкратно для получения достоверных результатов. Чашки с посевами культивировать в термостате при температуре 28⁰С в течение 2-5 суток.

3. Провести учет выросших культур.

После инкубации учесть диаметр выросших колоний и сравнить с ростом аналогичных культур в контроле и опыте. Торможение и стимулирование роста штаммов рассчитать по формуле Эббота:

$$T = \frac{D_k - D_o}{D_k} \times 100 \%,$$

где T – торможение (подавление) роста по сравнению с контролем, %;

D_k – диаметр колоний в контроле, мм; D_o – диаметр колоний в опыте, мм.

В случае стимулирования роста микробов показатель T (торможения) имеет отрицательное значение, а при подавлении их роста – положительное.

Результаты записать в таблицу. Примерное оформление результатов дано в таблице 9.

Таблица 9

Чувствительность чистых культур гетеротрофных бактерий к пестициду

Штаммы	Диаметр колонии, мм		Торможение роста, %
	в контроле	в опыте	
1	6	7	-16,6
8	10	9	10
23	7	17	-142,8

6 д е н ь

Определение у микроорганизмов способности усваивать углерод из пестицидов

Считается, что для питания и энергии микроорганизмы используют самые различные химические соединения. В результате происходит трансформация (преобразование) пестицида с последующей утратой токсических свойств. Такое преобразование пестицида определяется способностью химического соединения индуцировать у микроба синтез ферментов подготовительного

цикла, зависящего от структуры молекулы пестицида и природного аналога.

Различают два типа трансформации ксенобиотиков:

- микробы способны интенсивно расти, размножаться и накапливаться, используя пестицид в качестве источника питания,
- микробы не способны усваивать пестицид в процессах метаболизма, но в присутствии ростовых субстратов происходит индукция синтеза соответствующих ферментов, катализирующих способность трансформировать химическое соединение. Эта особенность получила название кометаболизма, т.е. сопряженных ферментативных реакций обмена, при котором косубстраты (пестициды) влияют на рост и развитие микробов только в присутствии ростовых органических соединений.

1. Высев микроорганизмов на селективную среду

Выполнение данной работы следует проводить с использованием чистых культур бактерий, обладающих отрицательным коэффициентом торможения, и специальной безуглеродной среды (М 9), содержащей различные углеродные субстраты: дрожжевой автолизат (ДА) или глюкозу (Г), пестицид (П) или оба соединения одновременно.

В среду добавить индикатор бромтимоловый синий или 5%-ный 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) для выявления бактерий деструкторов. Высев исследуемых культур на агаровые пластинки осуществлять методом отпечатков или уколом.

Питательную среду, содержащую ДА (или Г), используют в качестве контроля роста микробов. Среда, содержащая только пестицид (единственный источник углерода), служит показателем использования его как источника питания микроорганизмов, а в среде, содержащей препарат и дрожжевой автолизат (или глюкозу), выявляют бактерии, разлагающие пестицид в условиях кометаболизма.

2. Анализ полученных данных.

После инкубации посевов в термостате при температуре 28⁰ С необходимо отметить наличие или отсутствие роста микроорганизмов и зон просветления вокруг выросших колоний бактерий. Полученные результаты занести в таблицу, проанализировать и отметить штаммы-деструкторы. Примерное оформление результатов представлено в таблице 10.

Таблица 10

Способность микроорганизмов использовать углерод пестицида

Штаммы	Среды культивирования		
	М9 + ДА (Г)	М9 + П + ДА (Г)	М9 + П
1	+	+	-
23	+	+	±
36	+	-	+

Примечание: «+» – наличие зоны просветления; «-» отсутствие зоны просветления; «±» – сомнительный результат.

7 день**Изучение деструктивного влияния микроорганизмов на пестициды****1. Посев исследуемых культур на среду**

В данной работе используются культуры бактерий-деструкторов пестицидов, отобранные в предыдущих опытах. Среди этих культур необходимо отобрать штаммы с явными признаками роста и размножения в присутствии пестицида как единственного источника углерода и изучить их роль в превращении препаратов. Для этого суточные культуры штаммов – деструкторов засевают (500 млн м.к.) в колбы Эрленмейера, содержащие 100 мл синтетической среды М 9 с внесенным в нее 200-500 мкг/мл пестицида. Измеряют оптическую плотность сред и культивируют в термостате при 28⁰С. Аэрацию среды осуществляют с помощью круговой качалки.

2. Измерение концентрации пестицида и микроорганизмов

Изменение концентрации пестицида и прирост биомассы штаммов отмечают помощью концентрационного фотоэлектроколориметра (ФЭК, КФК-2) в течение нескольких дней.

Для измерения оптической плотности культуральную жидкость необходимо предварительно отцентрифугировать при 8000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования в супернатанте (надосадочная жидкость) определить концентрацию пестицида по отношению к контролю (среда М 9). Полученный центрифугат разбавить физиологическим раствором и определить концентрацию микробных клеток.

3. Построение калибровочных графиков для количественного определения концентрации пестицида и микроорганизмов.

Для количественного определения концентрации пестицида и микробных клеток строят калибровочные графики, отражающие зависимость оптической плотности от концентрации пестицида и микроорганизмов. С этой целью готовят серии разведений с различными концентрациями пестицида и микробов в среде М 9 и измеряют их оптическую плотность. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию препарата и микробных клеток. Для каждой культуры микроорганизмов строят свою калибровочную кривую, так как оптическая плотность зависит от размеров клеток.

Контрольные вопросы

1. Понятие «ксенобиотики» и их классификация.
2. Классификация пестицидов по химической природе, областям применения и механизму действия.
3. Влияние пестицидов на микроорганизмы почвы.
4. Деградация пестицидов микроорганизмами в процессах метаболизма и кометаболизма.
5. Методы выявления микроорганизмов деструкторов в почве.
6. Индикация штаммов–деструкторов на фоне автохтонной микробиоты почв.

7. Биопрепараты на основе штаммов деструкторов.
8. Оценка токсичности почв, загрязненных пестицидами.

Список рекомендуемой литературы

1. Мельников, Н.Н. Пестициды: химия, технология и применение. / Н.Н. Мельников // М.: Химия, 1987. 712 с.
2. Звягинцев, Д.Г. Некоторые концепции строения и функционирования комплекса почвенных микроорганизмов / Д.Г. Звягинцев // Вестник МГУ. 1978. №4. С. 63-72.
3. Звягинцев, Д.Г. Почва и микроорганизмы. – М.: Изд-во МГУ, 1987. – 256с.
4. Гудзеев, Г.С. Химическая защита растений. / Г.С. Гудзеев // М.: Агропромиздат, 1987. 415 с.
5. Справочник по пестицидам / Н.Н. Мельников [и др.] // М.: Химия, 1985. – 352 с.
6. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы / В.В. Вельков // Биотехнология. – 1995. – № 3–4. – С. 20 – 27.
7. Головлева Л.А. Микробиологическая деградация пестицидов / Л.А. Головлева, Е.Г. Головлев // Успехи микробиологии. – 1980. – Т. 15 – С. 137–179.

ЗАДАЧА № 12

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕСС СПОРООБРАЗОВАНИЯ У БАЦИЛЛ

Представители рода *Bacillus* широко распространены в окружающей среде. Они являются постоянными обитателями почвы, воды, растительных и животных остатков. Бациллы принимают активное участие в процессах круговорота углерода: аммонификации (большинство видов), разложении крахмала (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. brevis* и др.), пектинов (*B. macerans* и др.); круговорота азота: азотфиксации (*B. azotoformans*), денитрификации (*B. megaterium*, *B. pasteurii*, *B. subtilis* и др.), разложении мочевины (*B. pasteurii*, *B. globisporus*). Многие бациллы являются продуцентами антибиотиков (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и др.), используются для борьбы с насекомыми-вредителями (*B. thuringiensis*). Однако среди бацилл есть и патогенные виды: *B. anthracis* – возбудитель сибирской язвы, *B. cereus* – возбудитель пищевых токсикоинфекций. Большую роль представители рода *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* и др.) играют в порче продуктов питания и сырья растительного и животного происхождения.

Выживать в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды бациллам позволяет их способность к спорообразованию. Виды рода *Bacillus*, как и другие спорообразующие бактерии, обладают механизмами, с помощью которых они распознают определённые изменения в окружающей среде, например, уменьшение содержания источников энергии и питательных веществ, некоторых аминокислот и оснований. В ответ на это в клетке

происходят метаболические изменения, которые и запускают споруляцию.

Цель работы: выделить из объектов окружающей среды штамм рода *Bacillus*, идентифицировать его до вида; изучить влияние состава и pH питательной среды, температуры культивирования на динамику спорообразования выделенного штамма.

Оборудование:

Посуда: чашки Петри, пробирки, пипетки, шпатель.

Питательные среды: физиологический раствор; ГРМ-агар; ГРМ-агар с добавлением 2 % глюкозы; ГРМ-агар с добавлением 2 % лактозы; ГРМ-агар с добавлением 5 % NaCl; ГРМ-агар с добавлением 7,5 % NaCl; ГРМ-агар (pH=5,5); ГРМ-агар (pH=10); полужидкий ГРМ-агар.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Выделение штамма рода *Bacillus* из объектов окружающей среды (почвы, продуктов питания и т.д.)

Произвести разведение исследуемого субстрата до 10^{-3} - 10^{-4} . Из последнего разведения произвести высеивание 0,1 мл взвеси на чашку с ГРМ-агаром. Инкубировать при 28 °С.

3 день

Получение чистой культуры рода *Bacillus*

Приготовить мазки из выросших колоний, окрасить по Граму. Отобрать одну изолированную колонию бацилл, пересеять ее на скошенный ГРМ-агар.

*За сутки до проведения дальнейшей работы необходимо отсеять выделенный штамм рода *Bacillus* на скошенный ГРМ-агар.

4 день

Посев выделенного штамма рода *Bacillus* на дифференциально-диагностические среды

1. Проверить на чистоту суточную культуру исследуемого штамма рода *Bacillus*.

2. Приготовить мазок из 3-4 суточной культуры исследуемого штамма. Окрасить по Пешкову на выявление спор. Отметить форму, положение споры в клетке, раздутость спорангия.

3. Определить каталазную активность, подвижность исследуемого штамма, измерить величину микробных клеток.

4. Засеять исследуемую культуру на дифференциально-диагностические среды (см табл. 1).

*За сутки до проведения дальнейшей работы необходимо отсеять выделенный штамм рода *Bacillus* на скошенный ГРМ-агар.

5 день

Идентификация выделенного штамма *Bacillus* и его посев на питательные среды различного состава

1. По результатам изучения культуральных, морфологических, биохимических свойств идентифицировать выделенный штамм рода *Bacillus* по «Определителю зоопатогенных микроорганизмов» (Сидоров и др., 1995).

2. Засеять суточную культуру исследуемого штамма на скошенный агар с различными средами: ГРМ-агар; ГРМ-агар + 2 % глюкозы; ГРМ-агар + 2 % лактозы; ГРМ-агар + 5 % NaCl; ГРМ-агар + 7,5 % NaCl; ГРМ-агар с pH=5,5; ГРМ-агар с pH=10. Посевы поставить на инкубацию при 28 °С.

3. Засеять суточную культуру исследуемого штамма в 2 пробирки со скошенным ГРМ-агаром; одну пробирку поставить на инкубацию при 10 °С, вторую – при 43 °С.

*На 1, 2, 3, 4, 5 сутки следует делать мазки из посевов, культивируемых в различных условиях, и тщательно их промаркировать.

6 день

Анализ влияния состава и pH питательной среды, температуры культивирования на динамику спорообразования выделенного штамма рода *Bacillus*

1. Все мазки окрасить по Граму или по Пешкову. На каждом мазке в поле зрения микроскопа подсчитать количество вегетативных клеток без споры и количество спорулирующих клеток и отдельно лежащих спор. Общее количество вегетативных клеток без споры, спорулирующих клеток и отдельно лежащих спор в поле зрения микроскопа принять за 100 %. Выразить в процентах количество спорулирующих клеток и отдельно лежащих спор (вместе). По результатам подсчётов в трёх полях зрения найти средний процент спорулирующих клеток и отдельных спор для каждого мазка. Результаты занести в таблицу 11.

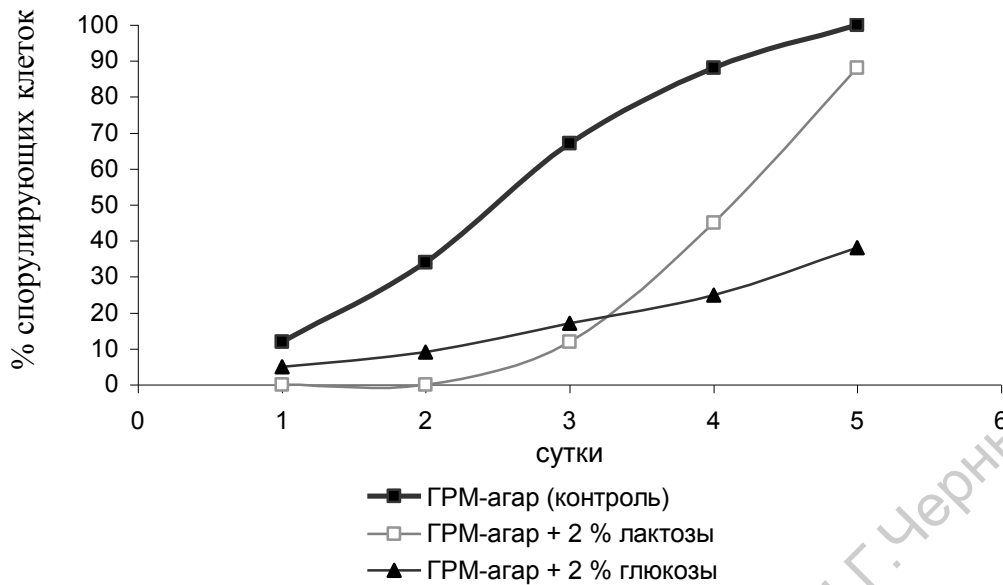
Таблица 11

Количество (%) спорулирующих клеток и отдельных спор, образованных исследуемым штаммом при различных условиях культивирования

Сутки	Режимы культивирования								
	ГРМ-агар, 28°C	ГРМ-агар, 10°C	ГРМ-агар, 43°C	ГРМ-агар, pH=10	ГРМ-агар, pH=5,5	ГРМ-агар + 2% глюкозы	ГРМ-агар + 2% лактозы	ГРМ-агар + 5% NaCl	ГРМ-агар + 7,5% NaCl
1									
2									
3									
4									
5									

2. Построить графики динамики спорообразования исследуемого штамма при различных условиях (1 – 4) культивирования (контроль – споруляция штамма на ГРМ-агаре при 28 °С (см. образец).

ОБРАЗЕЦ:



Влияние некоторых углеводов на динамику споруляции штамма рода *Bacillus*

1: контроль, ГРМ-агар + 2 % глюкозы, ГРМ-агар + 2 % лактозы (см. образец рисунка);

2: контроль, ГРМ-агар (pH=10), ГРМ-агар (pH=5,5);

3: контроль, ГРМ-агар при 10 °С, ГРМ-агар при 43 °С;

4: контроль, ГРМ-агар + 5 % NaCl, ГРМ-агар + 7,5 % NaCl.

3. Сделать вывод о влиянии состава и pH питательной среды, температуры культивирования на динамику спорообразования выделенного штамма.

Контрольные вопросы

1. Спорообразующие бактерии (систематическое положение).
2. Дифференциальный диагноз спорообразующих бактерий.
3. Особенности идентификации бактерий рода *Bacillus*.
4. Роль бактерий рода *Bacillus* в природе.
5. Роль бактерий рода *Bacillus* в жизни человека.
6. Факторы, индуцирующие процесс спорообразования.
7. Механизм процесса спорообразования.
8. Бактериальная спора, её строение.
9. Влияние физико-химических факторов на процесс спорообразования.

Список рекомендуемой литературы

Громов Б.В. Строение бактерий. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. – 187 с.

Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2003. – 464 с.

Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А, Залепукин В.С. и др. Сибирская язва. – М.: Колос, 1996. – 335 с.

Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для медицинских вузов. – СПб.: СпецЛит, 2000. – 591 с.

Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса: В 2 т. – М.: Мир, 1997. –Т. 2. – 368 с.

Пивоваров Ю.П., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация). – М.: ИКАР, 2000. – 268 с.

Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995. – 318 с.

Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. – Киев: Наук. Думка, 1982. – 280 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. –С. 291 – 292.

ЗАДАЧА № 13

ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИОЦИНОГЕНИИ

Бактериоциногенность – наследственная способность бактерий продуцировать антибактериальные вещества – бактериоцины, подавляющие рост бактерий того же вида или близкородственных и обладающие антигенной активностью. Синтез бактериоцинов контролируется плазмидами. Феномен бактериоциногенности характеризуется важной особенностью: синтез бактериоцина является летальным процессом для продуцирующей его клетки. В бактериальной популяции бактериоцины продуцируют только отдельные клетки, которые затем погибают. Остальные клетки являются иммунными и сохраняют эту способность в течение ряда поколений. Генетические детерминанты, контролирующие синтез некоторых бактериоцинов, могут быть переданы небактериоциногенным особям при совместном культивировании в процессе конъюгации.

Чувствительность или резистентность бактерий к действию бактериоцина определяется наличием специальных структур-рецепторов на поверхности клетки, с помощью которых осуществляется адсорбция бактериоцинов. Штаммы, утратившие способность синтезировать определенные рецепторы, становятся резистентными к соответствующему бактериоцину.

Первые бактериоцины были обнаружены у кишечной палочки и названы колицинами. Разные колицины различаются по механизму действия. Так, колицин Е1 повышают проницаемость плазматической мембраны, колицин Е2 вызывает деграцию ДНК, колицин Е3 – деграцию рибосомной РНК. Вещества, аналогичные колицинам, в дальнейшем были описаны у многих бактерий, в том числе у *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Staphylococcus sp.*, *Vibrio cholerae* и др. Штаммы, продуцирующие бактериоцины, называют бактериоциногенными.

Синтез бактериоцина в большинстве клеток можно индуцировать различными физико-химическими воздействиями (УФ – излучение, перекиси, ДНК-тропные вещества и другие агенты).

Все бактериоцины обладают более или менее выраженной способностью диффундировать в агаровые среды. Скорость и интенсивность диффузии в агар определяется величиной молекулы бактериоцина. Морфология зон торможения роста чувствительных бактерий имеет характерные особенности для каждого штамма. Так, для одних бактериоцинов типично полное отсутствие роста чувствительной культуры вокруг колонии продуцента, для других характерен равномерно разреженный, резко ослабленный рост в виде отдельных колоний, резистентных к действию бактериоцина. Край зоны торможения может быть четко очерчен, либо сглажен постепенным переходом к сплошному росту газона.

Для выявления бактериоциногенных штаммов применяют эталонные культуры из набора Фредерика. П. Фредерик с сотрудниками разделил колицины, продуцируемые различными штаммами энтеробактерий, на 17 типов, обозначив их А, В, С, D, E, F, G, H, I, J, K, V, S1, S2, S3, S4, S5 (табл. 12). Для определения колицинотипа используются эталонные штаммы из набора Фредерика, для определения колициногенотипа – индикаторные культуры *E. coli* Row, *E. coli* K 12, *E. coli* φ, *E. coli* β.

Таблица 12

Эталонные культуры из коллекции Фредерика

Наименование штамма	Тип колицина	Наименование штамма	Тип колицина
CA 7 – <i>E. coli</i>	V	K 235 – <i>E. coli</i>	K
CA 18 – // -	B	PI – <i>Shigella dysenteriae</i>	S1
CA 23 - // -	D	P9 – <i>S. sonnei</i>	S3+1
CA 31 – <i>E. freundii</i>	A	P14 – <i>S. dispar</i>	S5
CA 38 – <i>E. coli</i>	E + J	P15 - // -	S4
CA 53 - // -	I	CA 42 – <i>E. coli</i>	F
CA 58 - // -	H	CA 46 - // -	G
CA 62 - // -	J + I		

Цель работы: изучить спектр чувствительности штамма *E. coli* M-17 к колицинам эталонных штаммов из набора Фредерика (определить колицинотип); выявить способность исследуемого штамма *E. coli* M-17 продуцировать колицины (определить колициногенотип).

Оборудование:

Посуда: пробирки, пипетки, чашки Петри.

Питательные среды: ГРМ-агар; 0,75 %-ный ГРМ-агар (2 пробирки по 10 мл); ГРМ-бульон.

1 д е н ь

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

* За 1 сутки до исследования необходимо отсеять эталонные штаммы *E. coli* из

набора Фредерика на скошенный ГРМ-агар.

2 д е н ь

Определение колицинотипа: посев эталонных штаммов *E. coli* из набора Фредерика

Произвести посев эталонных штаммов *E. coli* из набора Фредерика со скошенного агара на чашки Петри с ГРМ-агаром по секторам методом отпечатка (чашки должны быть хорошо высушены!). Указать под каждым сектором номер штамма. Поместить чашки в термостат при 37 °С на 48 часов.

*За сутки до проведения дальнейшей работы отсеять исследуемую культуру *E. coli* М-17 на скошенный ГРМ-агар.

3 д е н ь

Определение колицинотипа: посев исследуемого штамма *E. coli* М-17

1. Суточную культуру исследуемого штамма *E. coli* М-17 посеять в пробирку с 2 мл ГРМ-бульона и поместить в термостат при 37 °С на 4 часа.

2. Обработать чашки с посевами эталонных штаммов хлороформом. Для этого на дно крышек чашек Петри положить пинцетом стерильный кусочек ваты, смоченный несколькими каплями хлороформа. Оставить чашки закрытыми в перевернутом положении на 45 мин. Затем удалить вату, чашки оставить приоткрытыми на 10 – 15 минут для удаления паров хлороформа.

3. Расплавить 0,75 %-ный ГРМ-агар в пробирках на водяной бане.

4. В 2 пробирки с 0,75 %-ный ГРМ-агаром внести по 0,1 мл 4 часовой бульонной культуры исследуемого штамма *E. coli* М-17. Размешать агар и равномерно наслоить на чашки, обработанные хлороформом. После застывания верхнего слоя агара чашки поместить в термостат при 37 °С на 24 часа.

4 д е н ь

Определение колицинотипа исследуемого штамма *E. coli* М-17

Отметить и измерить зоны ингибирования роста исследуемой культуры *E. coli* М-17 вокруг эталонных штаммов, определить ее спектр чувствительности к различным типам колицинов по таблице 8.

*За сутки до проведения дальнейшей работы необходимо отсеять исследуемую культуру на скошенный ГРМ-агар.

5 д е н ь

Определение колициногенотипа: посев исследуемой культуры на чашки Петри по секторам

1. Разлить стерильный ГРМ-агар в чашки Петри и подсушить (количество чашек Петри должно соответствовать количеству используемых индикаторных штаммов из набора Фредерика).

2. Суточную исследуемую культуру засеять методом отпечатка на отдельный сектор во все чашки Петри (количество секторов должно соответствовать количеству исследуемых культур) Чашки с посевами

поместить в термостат на 37 °С на 48 часов.

* За 1 сутки до исследования лаборантом отсеваются индикаторные штаммы *E. coli* из набора Фредерика на скошенный ГРМ-агар.

6 д е н ь

Определение колициногенотипа: посев индикаторных штаммов *E. coli* из набора Фредерика

1. Суточные культуры индикаторных штаммов *E. coli* из набора Фредерика посеять в пробирки с 2 мл ГРМ-бульона и поместить в термостат при 37 °С на 4 часа.

2. Обработать чашки с посевами исследуемых культур хлороформом (см. 3 день).

3. Расплавить 0,75 %-ный ГРМ-агар в пробирках на водяной бане.

4. В каждую пробирку с 0,75 %-ный ГРМ-агаром внести по 0,1 мл одной из бульонных культур индикаторных штаммов. Размешать агар и равномерно наложить на чашки, обработанные хлороформом. После застывания верхнего слоя агара чашки поместить в термостат при 37 °С на 24 часа.

7 д е н ь

Определение колициногенотипа исследуемой культуры

Отметить и измерить зоны ингибирования роста индикаторных культур *E. coli* из набора Фредерика вокруг исследуемых штаммов. Определить колициногенотип исследуемой культуры по таблице 13.

Таблица 13

Определение колициногенотипа исследуемой культуры

Колициногенотип	Эталонные штаммы			
	<i>E. coli</i> φ	<i>E. coli</i> K-12	<i>E. coli</i> β	<i>E. coli</i> Row
I	+	+	+	-
II	+	+	-	-
III	-	+	+	-
IV	-	+	-	-
V	+	-	-	-
VI	-	-	-	+

Примечание. «+» Образование стерильных бляшек на газоне с данным эталонным штаммом под действием колицина исследуемой культуры; «-» отсутствие бляшек.

Контрольные вопросы

1. Бактериоцины: общее понятие, химическая природа, классификация.
2. Бактериоцины, продуцируемые различными видами микроорганизмов.
3. Сравнительная характеристика бактериоцинов и антибиотиков.
4. Генетический контроль синтеза бактериоцинов.
5. Индукция синтеза бактериоцинов.

6. Механизм действия бактериоцинов.
7. Влияние физико-химических факторов на синтез бактериоцинов.
8. Методы изучения бактериоцинов.
9. Эталонные и индикаторные штаммы из набора Фредерика.
10. Экологическое, патогенетическое и эпидемиологическое значение бактериоциногенности.

Список рекомендуемой литературы

- Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления // Журн. микробиологии. – 2003. – № 3. – С. 109 – 113.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – С. 210 - 211.
- Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. – Л.: Медицина, 1966. – 203 с.
- Сборник методик по генетике микроорганизмов / Под ред. Р. Клауса, У. Хейса. – М.: Медицина, 1970. – 248 с.

ЗАДАЧА № 14 ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Ультрафиолетовое излучение — электромагнитное излучение с длиной волны 400 – 200 нм. Различают ближнее УФ-излучение, среднее и дальнее. Ближнее УФ-излучение имеет длину волны 400 – 320 нм и даже при небольших дозах оказывает на бактерии негативное воздействие — замедляет скорость роста, угнетает индукцию ферментов и др. Относительно высокие дозы ближнего УФ-излучения вызывают мутагенный и летальный эффекты. При этом прежде всего повреждаются молекулы ДНК. В них возникают пиримидиновые (тимин, цитозин) димеры, ингибирующие репликацию.

Среднее (320 – 290 нм) и дальнее (290 – 200 нм) УФ-излучения оказывают на микроорганизмы сходное действие. Эти виды УФ-лучей обладают высоким мутагенным и летальным эффектами, что объясняется интенсивным поглощением молекулами ДНК электромагнитного излучения в области 240 – 300 нм. Среднее и дальнее УФ-излучения наряду с образованием пиримидиновых димеров приводят к образованию сшивок ДНК с белком, разрыву цепей, денатурации ДНК и другим повреждениям.

Однако УФ-излучение не всегда вызывает гибель клеток микроорганизмов. Повреждения ДНК могут быть устранены двумя путями: фотореактивацией и темновой репарацией. В первом случае поврежденное место репарируется ферментом, активируемым синим (видимым) светом, который исправляет структуру ДНК, расщепляя связи между тиминовыми основаниями в димерах. Во втором случае повреждения устраняются с помощью ферментов: эндонуклеазы (вырезает поврежденный участок), полимеразы (синтезирует правильную структуру по комплементарной цепи) и

лигазы (сшивает синтезированные последовательности).

При изучении действия УФ-излучения на бактерии, клетки следует облучать в буферных растворах, так как вещества питательного бульона интенсивно поглощают УФ-лучи, снижая тем самым дозу, получаемую клетками. В то же время образующиеся в бульоне под действием облучения токсичные перекиси увеличивают летальное действие УФ-лучей на клетки. Все манипуляции следует осуществлять в условиях, исключающих воздействие видимого света, чтобы процесс фотореактивации не исказил результаты.

Цель работы: изучить летальное действие УФ-излучения на клетки бактерий рода *Staphylococcus* и определить зависимость выживаемости клеток от дозы облучения.

Оборудование:

Посуда: пробирки, пипетки, чашки Петри, стерильные центрифужные пробирки, стерильные стеклянные палочки, шпатель, стерильные ватные тампоны.

Питательные среды: ГРМ-агар; 0,75 %-ный ГРМ-агар (2 пробирки по 10 мл); ГРМ-бульон.

Дополнительное оборудование: центрифуга, УФ-облучатель, черная бумага, непрозрачный контейнер для пробирок.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

2 день

Выделение штаммов стафилококков с поверхности кожи рук

1. С помощью стерильного ватного тампона произвести смыв с поверхности кожи рук и сделать посев на чашку с ГРМ-агаром.
2. Приготовить оксидазно-ферментативный тест.

3 день

Отбор штаммов грамположительных кокков

1. Из выросших на ГРМ-агаре колоний приготовить мазки, окрасить по Граму.
2. С культурами грамположительных кокков поставить оксидазно-ферментативный тест.

4 день

Отбор штамма стафилококка для дальнейших исследований

1. На основании результатов оксидазно-ферментативного теста отобрать штамм грамположительных кокков, использующих глюкозу путём окисления и ферментации.
2. Приготовить дифференциально-диагностические среды, необходимые для идентификации стафилококка.

*За сутки до проведения дальнейшей работы отсеять исследуемую культуру на скошенный ГРМ-агар.

5 д е н ь

Изучение биохимической активности исследуемого штамма стафилококка

Исследуемый штамм стафилококка засеять на дифференциально-диагностические среды.

6 д е н ь

Идентификация выделенного штамма стафилококка

На основании изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств идентифицировать исследуемый штамм стафилококка по определителю бактерий Берджи.

*За сутки до проведения дальнейшей работы отсеять 1 полную петлю исследуемого штамма стафилококка в колбу с 20 мл ГРМ-бульона. Колбу поместить в термостат при 37 °С.

7 д е н ь

Облучение исследуемых культур различными дозами УФ-лучей

1. Выросшую в колбе культуру стерильно отцентрифугировать в течение 10–15 мин при 6 тыс. об/мин, предварительно попарно уравновесив жидкость в центрифужных пробирках.

2. После осаждения клеток надосадочную жидкость слить в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок перемешать стеклянной стерильной палочкой до гомогенного состояния и залить фосфатным буфером (прил. 1) до прежнего уровня, снова отцентрифугировать в том же режиме.

3. Осажденные клетки ресуспендировать вышеприведенным способом в буфере (см. п. 2) и содержимое центрифужных пробирок слить в стерильную пробирку. Суспензию разлить по 3 мл в стерильные чашки Петри по числу вариантов опыта (контрольный вариант остается в пробирке). Все варианты опыта следует оберегать от попадания света.

4. Суспензию бактерий в открытых чашках Петри облучить с помощью ультрафиолетовой лампы. Облучение необходимо проводить на расстоянии 5 см от лампы в течение 8, 16, 24, 32, 40 с и т.д. В лаборатории, где включена лампа, следует находиться в специальных защитных очках для глаз. Для каждой дозы используется отдельная чашка с 3 мл суспензии (вариант опыта). Во время облучения чашку необходимо постоянно покачивать для перемешивания суспензии. После облучения чашки закрывают крышками и помещают в темное место.

5. Для определения количества жизнеспособных клеток из облученных и контрольной суспензий берут по 0,5 мл и делают ряд десятикратных разведений в фосфатном буфере, рН 7,0. Конечное разведение каждого варианта опыта зависит от дозы облучения (табл. 14).

**Расчет зависимости разведения бактериальной суспензии
от дозы облучения**

Вариант опыта	Экспозиция, с	Конечное разведение
К	0	10^{-8}
1	8	10^{-7}
2	16	10^{-6}
3	24	10^{-5}
4	32	10^{-4}
5	40	10^{-3}

6. Из пробирок с двумя последними разведениями каждого варианта, отобрать пипеткой по 0,1 мл, нанести на поверхность двух чашек Петри с ГРМ-агаром и тщательно растереть стеклянными шпателями. Чашки поместить в термостат при 37°C на 24 ч.

8 д е н ь

Расчет выживаемости бактериальных клеток при облучении различными дозами УФ-излучения

Подсчитать число колоний, выросших на чашках. Рассчитать количество жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии каждого варианта и выразить выживаемость облученных УФ-лучами клеток в процентах от контроля. Данные занести в таблицу 15. На основании полученных результатов установить время облучения, в течение которого УФ-лучи не оказывают летального действия на исследуемый штамм бактерий.

Таблица 15

Выживаемость бактериальных клеток при облучении различными дозами УФ-лучей

Вариант опыта	Разведение	Количество колоний на чашке	Число жизнеспособных клеток в 1 мл	Выживаемость, %

Контрольные вопросы

1. Воздействие УФ-излучения на бактериальные клетки.
2. Повреждения нуклеиновых кислот под действием УФ-лучей.
3. Механизмы фотореактивации и темновой репарации.
4. Влияние времени облучения на выживаемость бактерий.
5. Методика определения выживаемости бактерий при облучении различными дозами УФ-лучей.

Список рекомендуемой литературы

- Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2003. – С. 130 – 131.
- Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2004. – 348 с.
- Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. – М.: Академия, 2006. – С.100.
- Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. –М.: Мир, 1984. 176с.
- Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – С. 33 – 34.
- Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 2. – С. 73 – 94.

ЗАДАЧА № 15 ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ЛИЗОГЕНИИ

Лизогения – взаимодействие между бактериофагом и клеткой – хозяином, при котором внутри бактериальной клетки существует умеренный фаг в стадии профага. Теория лизогении была разработана в 1950 г. французскими учёными А. Львовым и А. Гутманом, показавшими, что лизогенное состояние связано с присутствием в клетках бактерий профага. Умеренными называют фаги, способные заражать бактерий-хозяев, но не размножающиеся в них и не вызывающие их лизиса. Профаг – это фаг, геном которого интегрирован в хромосому клетки-хозяина. Культура бактерий, содержащая профаг, называется лизогенной. При определенных условиях (например, во время облучения бактерий) фаг может перейти в свою активную форму, которая способна воспроизводить сама себя и в конечном итоге разрушать бактериальную клетку. В каждом поколении лизогенных бактерий лизису подвергается очень небольшая часть клеток.

В геноме бактерий могут содержаться одновременно профаги нескольких разных фагов (полилизогения). В этом случае клетка обладает иммунитетом в отношении всех этих фагов. В результате лизогении может произойти изменение некоторых свойств бактериальной клетки (лизогенная конверсия), обусловленное приобретением бактерией новой генетической информации. Искусственно полученные лизогенные бактерии по своим свойствам не отличаются от лизогенных бактерий, найденных в естественных условиях. У небольшой части потомства лизогенной клетки происходит потеря профага. Утратившие профаг клетки дают начало нелизогенным линиям. Частота этого процесса может быть увеличена, например, действием ультрафиолетовых лучей.

Умеренные фаги играют важную роль в обмене генетическим материалом между бактериями.

Цель работы: индуцировать фагопродукцию в бактериальных клетках и

выявить лизогенные культуры; определить титр выделенного фага исследуемой культуры.

Оборудование:

Посуда: пробирки, пипетки, чашки Петри.

Питательные среды: физиологический раствор; 0,75 %-ный ГРМ-агар; ГРМ-бульон.

Дополнительное оборудование: центрифуга, УФ-облучатель, черная бумага, непрозрачный контейнер для пробирок, хлороформ.

1 день

Подготовка и стерилизация необходимой посуды и питательных сред

*За сутки до проведения дальнейшей работы необходимо отсеять исследуемую культуру стафилококка (см. задачу № 11) в пробирку с 2 мл ГРМ-бульона.

2 день

Облучение исследуемой культуры стафилококка УФ-лучами для индуцирования фагопродукции

1. Произвести посев 0,1 мл суточной исследуемой культуры в пробирку с 2 мл ГРМ-бульона, инкубировать в термостате при 37 °С в течение 2,5 часов.

2. 2,5-часовую бульонную культуру, находящуюся в логарифмической фазе, отцентрифугировать при 5 тыс. об./мин в течение 20 – 30 мин.

3. Надосадочную жидкость слить, к полученному осадку добавить 5 мл стерильного физиологического раствора; 0,1 мл полученной взвеси смешать с 9,9 мл физиологического раствора.

4. 2 мл разведенной взвеси перенести в стерильную чашку Петри, поместить на расстоянии 40 см от центра УФ-источника, открыть чашку и провести облучение в течение времени, при котором УФ-лучи не оказывают летального действия на исследуемый штамм бактерий (см. задачу № 11).

*По окончании времени облучения все последующие действия необходимо выполнять в затемненном помещении или при красном свете, чтобы предотвратить фотореактивацию (обратное интегрирование фага).

5. 0,1 мл облученной взвеси перенести в пробирку, содержащую 9,9 мл ГРМ-бульона, которую следует обмотать черной бумагой и поместить в непрозрачный контейнер. Облученную культуру в контейнере поместить в термостат при 37 °С на 2 часа, а затем убрать в холодильник.

*За сутки до проведения дальнейшей работы лаборант отсеивает индикаторную культуру стафилококка в пробирку с 2 мл ГРМ-бульона.

3 день

Выявление чувствительности индикаторной культуры стафилококка к фагу исследуемой культуры методом агаровых слоёв

1. К 10 мл полученного фаголизата добавить 1 мл хлороформа на 20 минут для уничтожения бактериальных клеток. Пробирку периодически

встряхивать в течение 30 с, а потом дать отстояться. После оседания хлороформа на дно, с помощью пипетки осторожно перенести верхний слой жидкости в пустую стерильную пробирку.

2. ГРМ-агар разлить в 2 чашки Петри.

3. 2 пробирки с 0,75 %-ным агаром поместить на водяную баню до расплавления агара, после чего остудить до 40 – 45 °С.

4. В одну пробирку (опытную) внести 0,1 мл суточной индикаторной культуры и 1 мл фаголизата, а в другую (контрольную) – только 0,1 мл суточной индикаторной культуры. Содержимое пробирок перемешать и быстро вылить на поверхность застывшего ГРМ-агара в две чашки Петри соответственно. Необходимо, чтобы слой полужидкого агара равномерно покрыл всю поверхность ГРМ-агара и не образовывал комки и сгустки. Чашки с посевами культивировать в термостате при 37 °С в течение 48 ч.

*За сутки до проведения дальнейшей работы лаборант отсеивает индикаторную культуру стафилококка в пробирку с 2 мл ГРМ-бульона.

4 день

Анализ чувствительности индикаторной культуры стафилококка к фагу исследуемой культуры. Определение титра фага исследуемой культуры методом агаровых слоев

1. Провести анализ чувствительности индикаторной культуры к фагу. Подсчитать количество стерильных блюшек на чашке с опытным посевом. Сделать вывод об эффективности индуцированной фагопродукции и чувствительности индикаторной культуры стафилококка к фагу исследуемой культуры.

2. Определить титр фага исследуемой культуры:

- ГРМ-агар разлить в 10 чашек Петри;
- приготовить ряд последовательных десятикратных разведений фаголизата (от 10^{-1} до 10^{-10}) в пробирках с 0,9 мл ГРМ-бульона;
- на водяной бане расплавить 10 пробирок с 0,75 %-ным ГРМ-агаром;
- в каждую пробирку с расплавленным и остуженным до 45 °С ГРМ-агаром внести по 0,1 мл суточной индикаторной культуры и по 1 мл каждого разведения фаголизата. Взвесы хорошо перемешать и вылить на поверхность агара в 10 чашек Петри. Чашки с посевами культивировать в термостате при 37 °С в течение 24 ч.

5 день

Учет результатов определения титра фага исследуемой культуры

Произвести подсчет числа стерильных блюшек на чашках Петри с посевами. С учетом разведения фаголизата определить титр фага (содержание блюшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата). Величина титра обозначается как число 10 с положительной степенью. Сделать вывод о содержании фаговых частиц в 1 мл исследуемого фаголизата.

Контрольные вопросы

1. Явление лизогении, ее значение.
2. Строение и химический состав бактериофагов.
3. Типы взаимодействия фагов с бактериальной клеткой.
4. Понятие о лизогенной конверсии.
5. Специфичность бактериофагов.
6. Спонтанная и индуцированная продукция фага.
7. Индикаторные и эталонные культуры, используемые для изучения явления лизогении
8. Методы выявления бактериофагов.
9. Методы определения титра фага.

Список рекомендуемой литературы

- Равин В.К. Лизогения. – М.: Наука, 1971. – 134 с.
- Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – С. 33 – 34.
- Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – Т. 2. – С. 73 – 94.
- Стейниер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Д. Мир микробов. – М.: Мир, 1979. – Т. 2. – С. 165 – 186.
- Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – С. 147 – 151.

СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Модуль 1. Санитарная и медицинская микробиология

Раздел 1. Бактериологическое исследование пищевых продуктов.

Выявление бактериальной обсемененности исследуемого объекта, наличие в нем условно-патогенных бактерий, идентификация доминирующих видов.

Раздел 2. Микробиологическая оценка качества воды

Определение КМАФАнМ, коли-титра и коли-индекса исследуемого образца воды, выявление наличия в нем термотолерантных колиформных бактерий, сульфидредуцирующих клостридий и колифагов. Оформление заключения о качестве исследованной воды.

Раздел 3. Санитарно-микробиологическое исследование почвы

Определение КМАФАнМ, колиформных бактерий, энтерококков, целлюлозоразлагающих бактерий. Оформление заключения о качестве исследованной почвы.

Раздел 4. Изучение нормальной микрофлоры кожи человека

Выявление спектра видов, входящих в состав нормальной микрофлоры кожи человека, изучение их биологических свойств.

Раздел 5. Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам.

Выявление и идентификация условно-патогенного возбудителя гнойно-воспалительного процесса. Определение спектра его чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом. Выбор наиболее эффективного антибиотика, методом последовательных разведений определение его минимальной бактериостатической дозы для выделенного возбудителя.

Модуль 2. Использование микроорганизмов в биотехнологических процессах

Раздел 6. Изучение процесса спиртового брожения и его возбудителей.

Выделение чистых культур дрожжей из разных объектов, изучение их биологических свойств. Выделение чистых культур диких штаммов дрожжей. Закладка опыта по выявлению эффективности спиртового брожения, осуществляемого выделенными штаммами диких дрожжей. Микробиологический контроль процессов спиртового брожения, вызываемого изучаемыми штаммами дрожжей.

Раздел 7. Выделение молочнокислых бактерий и получение на их основе кисломолочных продуктов.

Выделение чистой культуры молочнокислых бактерий, изучение их биологических свойств, получение на их основе кисломолочных продуктов.

Раздел 8. Поиск новых штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотикоподобных веществ.

Выделение из почвы культуры актиномицетов, исследование влияния продуцируемых ими антибиотиков на изучаемого возбудителя. Изучение влияния фитонцидов и экстрактов некоторых лекарственных растений на выделенного возбудителя.

Раздел 9. Использование азотфиксирующих микроорганизмов в качестве основы биоудобрений.

Выделение из почвы чистой культуры свободноживущих аэробных бактерий, их идентификация и изучение биологических свойств. Изучение азотфиксирующей активности азотфиксаторов в зависимости от условий их культивирования в двух направлениях:

- 1) определение количества остаточного сахара эбулиостатическим методом,
- 2) определение количества накопленного азота по методу Кьельдаля, пересчёт количества фиксированного азота на один грамм израсходованного сахара.

Раздел 10. Получение накопительных культур микроорганизмов, устойчивых к ксенобиотикам и изучение их деструктивных свойств.

Выделение из почвы культур микроорганизмов, устойчивых к высоким дозам ксенобиотиков путем последовательных пассажей в среде М9. Выявление способности использовать загрязнитель в процессах метаболизма в качестве единственного источника углерода и энергии, определение скорости роста микроорганизмов при различных концентрациях ксенобиотика и изменения его концентрации в среде.

Модуль 3. Физиология и генетика микроорганизмов.

Раздел 11. Влияние некоторых физико-химических факторов на процесс спорообразования у бацилл.

Выделение из объектов окружающей среды штаммов бактерий рода *Bacillus*, идентификация их до вида. Изучение влияния состава и pH среды, температуры культивирования на динамику численности и спорообразования выделенных штаммов бацилл.

Раздел 12. Изучение явления бактериоциногении.

Исследование бактериоциногении в двух направлениях:

- 1) определение спектра чувствительности к бактериоциногенным штаммам – бакте-риоцинотипирование;
- 2) определение способности продуцировать бактериоцины – бактериоциногено-типирование.

Раздел 13. Изучение действия ультрафиолетовых лучей на бактериальные клетки.

Изучение действия ультрафиолетовых лучей на бактериальные клетки. Определить зависимость выживаемости бактериальных клеток от дозы облучения. Провести расчет выживаемости клеток при облучении различными дозами УФ-облучения.

Раздел 14. Изучение явления лизогении.

Изучение наследственной способности бактериальной клетки продуцировать фаг и выделять его в окружающую среду. Определение индуцированной фагопродукции, а также титр выделенного фага.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ

Раздел 1. Бактериологическое исследование пищевых продуктов.

1. Методы отбора проб для бактериологического анализа.
2. Методы количественного учета микроорганизмов в различных субстратах.
3. Питательные среды, используемые для выделения грибов.
4. Питательные среды, используемые для выделения *E.coli*.
5. Питательные среды, используемые для выделения стафилококков.
6. Изучение культуральных свойств микроорганизмов.
7. Изучение морфологических свойств микроорганизмов.
8. Методы выявления способности микроорганизмов расти в анаэробных условиях.
9. Изучение сахаролитических свойств микроорганизмов.
10. Методы выявления способности микроорганизмов к гидролизу казеина, желатины, крахмала, мочевины.
11. Методы выявления продукции сероводорода, индола, аммиака.
12. Методы выявления каталазной, оксидазной и лецитиназной активности.
13. Выявление способности микроорганизмов к редукции нитратов и использованию цитрата.
14. Методы выявления ферментов фенилаланиндезаминазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, орнитиндекарбоксилазы.
15. Методы выявления способности микроорганизмов к росту при определенных значениях температуры, pH, концентрации NaCl.
16. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамположительных неспоровых палочек.
17. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамотрицательных палочек.
18. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации бацилл.
19. Основные биохимические тесты, используемые для идентификации грамположительных кокков.

Раздел 2. Микробиологическая оценка качества воды.

1. Микрофлора воды. Вода как среда обитания микроорганизмов.
2. Роль воды в распространении инфекционных болезней. Патогенные микроорганизмы, обитающие в воде.
3. Методы очистки воды.
4. Санитарная оценка воды по микробиологическим показателям.
5. Методы забора проб воды для бактериологического анализа.
6. Методы определения ОМЧ воды.
7. Санитарно-показательные микроорганизмы. Требования, предъявляемые к ним.
8. Колиформные бактерии: общая характеристика, методы выявления, распространение в природе.

9. Морфологические, культуральные, биохимические, серологические свойства E.coli.
10. Дифференциально-диагностические среды, используемые для выделения E.coli.
11. Коли-титр, коли-индекс, методы определения.
12. Сульфитредуцирующие кластридии: значение для санитарной оценки качества воды, методы выявления.
13. Коли-фаги: значение для санитарной оценки качества воды, методы выявления.

Раздел 3. Санитарно-микробиологическое исследование почвы.

1. Почва как среда обитания микроорганизмов. Физико-химические свойства почвы.
2. Микроорганизмы почвы. Примеры.
3. Роль почвы в распространении инфекционных болезней.
4. Основные группы патогенных микроорганизмов, способные сохраняться в почве.
5. Санитарно-микробиологическое исследование почвы.
6. Методы отбора проб почвы.
7. Санитарно-показательные микроорганизмы почвы.
8. Питательные среды для выделения основных групп санитарно-показательных микроорганизмов почвы.
9. Методы изучения микроорганизмов, участвующих в круговороте азота.
10. Азотфиксирующие микроорганизмы. Примеры.
11. Методы изучения микроорганизмов, участвующих в круговороте углерода.
12. Целлюлозоразлагающие микроорганизмы. Примеры.

Раздел 4. Изучение нормальной микрофлоры кожи человека.

1. Нормальная микрофлора человека.
2. Значение нормальной микрофлоры.
3. Типы взаимоотношений между микроорганизмами, входящими в состав нормальной микрофлоры.
4. Пути формирования нормальной микрофлоры.
5. Биопленка: состав, функции.
6. Микрофлора кожи человека.
7. Методы выделения микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры.
8. Микроорганизмы, вызывающие инфекционные заболевания кожи человека.

Раздел 5. Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам.

1. Нормальная микрофлора кожных покровов и слизистых оболочек человека и животных.
2. Основные возбудители гнойно-воспалительных процессов.
3. Методы забора бактериологического материала из различных гнойно-воспалительных очагов.

4. Питательные среды, используемые для выделения и культивирования основных возбудителей гнойно-воспалительных процессов.

5. Дифференциальная диагностика возбудителей гнойно-воспалительных инфекций.

6. Классификация антибиотиков. Антибиотики, продуцируемые актиномицетами, грибами, бактериями, растениями, животными.

7. Механизм действия антибиотиков на бактериальные клетки и механизм лекарственной устойчивости бактерий.

8. Побочное действие антибиотиков на организм человека и животных.

9. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом.

10. Определение минимальной бактериостатической дозы антибиотика.

11. Проблема возникновения лекарственной устойчивости.

Раздел 6. Изучение процесса спиртового брожения и его возбудителей

1. Систематическое положение дрожжей

2. Естественное местообитание дрожжей.

3. Применение дрожжей.

4. Методы получения чистой культуры дрожжей.

5. Изучение биохимических свойств.

6. Размножение дрожжей.

7. Пищевые потребности дрожжей.

8. Способы получения энергии.

9. Изучение способности дрожжей к спорообразованию.

Раздел 7. Выделение молочнокислых бактерий и получение на их основе кисломолочных продуктов.

1. Систематическое положение молочнокислых бактерий (МКБ).

2. Особенности морфологии МКБ.

3. Особенности физиологии МКБ.

4. Естественные местообитания МКБ.

5. Применение МКБ в производстве продуктов питания.

6. Молочнокислые бактерии, используемые в качестве закваски при производстве молочнокислых продуктов.

7. Среда, используемые для выделения МКБ.

8. Идентификация МКБ.

Раздел 8. Поиск новых штаммов микроорганизмов – продуцентов антибиотикоподобных веществ.

1. Особенности систематического положения актиномицетов.

2. Культуральные и морфологические свойства актиномицетов.

3. Распространение актиномицетов.

4. Методы выделения актиномицетов. Питательные среды, используемые для культивирования актиномицетов.

5. Биотехнологические методы получения антибиотиков.

6. Фитонциды: основные продуценты, механизм действия на бактериальные клетки.

7. Практическое применение фитонцидов.

8. Методы выявления бактериостатического и бактерицидного действия различных веществ на бактериальную культуру.

Раздел 9. Использование азотфиксирующих микроорганизмов в качестве основы биоудобрений

1. Основные микроорганизмы-азотфиксаторы, их морфологические и физиолого-биохимические особенности.

2. Биохимия процесса фиксации азота свободноживущими бактериями.

3. Особенности фиксации азота симбиотическими бактериями.

4. Основные методы изучения процесса азотфиксации

5. Систематическое положение азотобактера, основные виды.

6. Морфологические и культуральные свойства азотобактера.

7. Методы выявления капсулы. Роль капсулы у патогенных и непатогенных микроорганизмов.

8. Основные источники С и N, используемые азотобактером. Отношение азотобактера к кислороду.

9. Распространение азотобактера в природе, его приуроченность к различным типам почв.

10. Удобрения, производимые на основе азотобактера. Основные сельскохозяйственные культуры, под которые вносят эти удобрения.

11. Основные бактериальные удобрения и области их применения.

12. Методика выделения культуры азотобактера из почвы, используемые среды.

13. Эбулиостатический метод определения сахаров, используемые реактивы и материалы, ход анализа.

14. Метод определения азота по Кьельдалю, основные этапы, используемые реактивы и материалы.

15. Принцип расчета азотфиксирующей активности, единицы измерения.

Раздел 10. Получение накопительных культур микроорганизмов, устойчивых к ксенобиотикам и изучение их деструктивных свойств.

Выявление динамики численности почвенных микроорганизмов под действием различных доз пестицидов.

Выделение из почвы культур микроорганизмов, устойчивых к высоким дозам ксенобиотиков путем последовательных пассажей в среде М9.

Выявление способности использовать загрязнитель в процессах метаболизма в качестве единственного источника углерода и энергии.

Определение скорости роста микроорганизмов при различных концентрациях ксенобиотика.

Определение изменения концентрации ксенобиотика в среде.

Раздел 11. Влияние некоторых физико-химических факторов на процесс спорообразования у бацилл.

1. Спорообразующие бактерии (систематическое положение).

2. Дифференциальный диагноз спорообразующих бактерий.

3. Особенности идентификации бактерий рода *Bacillus*.

4. Роль бактерий рода *Bacillus* в жизни человека.

5. Факторы, индуцирующие процесс спорообразования.

6. Механизм процесса спорообразования.

7. Строение бактериальной споры.

8. Влияние физико-химических факторов на процесс спорообразования.

Раздел 12. Изучение явления бактериоциногении.

1. Понятие о бактериоциногении и бактериоцинах. Бактериоцины различных бактерий.

2. Механизм действия бактериоцинов на бактериальную клетку.

3. Влияние внешних условий на синтез бактериоцинов.

4. Понятие о бактериоцинотипировании и бактериоциногенотипировании.

5. Методика изучения бактериоцинотипирования.

6. Методика изучения бактериоциногенотипирования.

7. Набор Фредерика, эталонные и индикаторные культуры и их назначение.

8. Биологическое и практическое значение явления бактериоциногении.

Раздел 13. Изучение действия ультрафиолетовых лучей на бактериальные клетки.

1. Воздействие УФ-лучей на бактериальные клетки.

2. Повреждения нуклеиновых кислот под действием УФ-лучей.

3. Механизмы фотореактивации и темновой репарации.

4. Влияние времени облучения на выживаемость бактерий.

5. Методика определения выживаемости бактерий при облучении различными дозами УФ-лучей.

Раздел 14. Изучение явления лизогении.

1. Бактериофаги, кем, когда были открыты.

2. Строение бактериофага, его специфичность.

3. Формы существования фага: зрелый, профаг, вегетативный.

4. Вирулентные и умеренные фаги. Мутанты умеренных фагов, условия, способствующие их образованию.

5. Спонтанная и индуцированная продукция фага. Методы изучения спонтанной и индуцированной фагопродукции.

6. Значение фага в передаче наследственной информации. Фаг в промышленной микробиологии, в медицине.

7. Явление лизогении, её значение.

8. Методы выявления лизогенности бактерий.

9. Какие культуры могут выступать в роли индикаторных культур при выявлении лизогении.

10. Что является контролем при выявлении лизогении методом двуслойного агара. Почему он необходим.

Среды для культивирования микроорганизмов**1. Глюкозо-пептонная**

пептон – 1 г; NaCl – 0,5 г; глюкоза – 0,5 г; 1,6 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего – 0,2 мл; вода – 100 мл.

2. Концентрированная глюкозо-пептонная

пептон – 10 г; NaCl – 5 г; глюкоза – 5 г; 1,6 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего – 2 мл; вода – 100 мл.

3. Гаузе

крахмал – 2 г; K_2HPO_4 – 0,05 г; KNO_3 – 0,1 г; $MgSO_4$ – 0,05 г; NaCl – 0,05 г; $FeSO_4$ – 0,001 г; агар – 2 г; вода – 100 мл; pH = 7,2-7,3.

4. Жидкая среда для актиномицетов

ГРМ-бульон – 3 мл; пептон – 0,5 г; глюкоза – 1 г; NaCl – 0,5 г; вода – 100 мл, pH = 7,2-7,3.

5. Синтетическая среда для культивирования дрожжей

сахароза – 15 г; пептон – 0,5 г; KH_2PO_4 – 0,3 г; $MgSO_4$ – 0,1 г. Среду не стерилизовать.

6. Эшби агаризованная

глюкоза – 2 г, KH_2PO_4 – 0,02 г; $MgSO_4$ – 0,02 г; NaCl – 0,02 г; K_2SO_4 – 0,02 г; $CaCO_3$ – 0,05 г; агар – 2 г; вода – 100 мл.

7. Эшби жидкая

глюкоза – 2 г; KH_2PO_4 – 0,02 г; $MgSO_4$ – 0,02 г; NaCl – 0,02 г; K_2SO_4 – 0,02 г; $CaCO_3$ – 0,05 г; вода – 100 мл.

8. Эшби жидкая с добавлением соли молибдена или бора

глюкоза – 2 г; KH_2PO_4 – 0,02 г; $MgSO_4$ – 0,02 г; NaCl – 0,02 г; K_2SO_4 – 0,02 г; $CaCO_3$ – 0,05 г; соль молибдена или бора – 0,01 г; вода – 100 мл

9. МБ

дрожжевой экстракт – 1,2 г; $CaCO_3$ – 1 г; $MgSO_4$ – 0,1 г; NaCl – 0,3 г; K_2HPO_4 – 0,2 г; глюкоза – 2 г; агар – 1,25 г; вода – 100 мл.

10. Капустный агар с мелом

капустный бульон – 100 мл; дрожжевой экстракт – 1,5 г; пептон – 1 г; глюкоза – 2 г; $CaCO_3$ – 2,5 г; $MnSO_4$ – 0,025 г; CH_3COONa – 0,3 г; агар – 2 г.

11. Сабуро

для первичного выделения грибов:

пептон – 1 %, мальтоза 4 %, агар – агар – 2 %; pH 6,5 - 7
 для хранения грибов: пептон – 1 %, агар–агар 2 %; pH 6,5 - 7

12. М9

Na_2HPO_4 – 6,0 г, KH_2PO_4 – 3,0 г, NaCl – 0,5 г, NH_4Cl – 1,0; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7,1 – 7,4.

Отдельно готовят 0,01 М раствор CaCl_2 , который добавляют в среду 10 мл на 1 л среды.

13. СМС

Na_2HPO_4 – 7,0 г, KH_2PO_4 – 0,2 г, KCl – 0,5 г; вода дистиллированная – 1000 мл; pH 7,5 – 8,0.

Химические реактивы

1. Фосфатный буфер

Смешать 2 раствора:

I раствор: KH_2PO_4 – 0,45 г; вода – 50 мл.

II раствор: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,6 г; вода – 50 мл; pH = 7,0.

2. Фиксатор Карнуа

Этиловый спирт 96⁰ – 60 мл, хлороформ – 30 мл, ледяная уксусная кислота – 10 мл, время фиксации – 15 мин.

Приложение 2

Методы выявления включений в клетках микроорганизмов

1. Выявление поли-В-оксимасляной кислоты:

- фиксированный мазок окрасить суданом III (0,1 г сухой краски растворить в 200 мл 96 %-ного спирта) в течение 5-15 мин;
- краситель смыть, препарат подсушить;
- препарат обработать ксилолом, несколько раз погружая в него стекло (общее время обесцвечивания не должно превышать 1 мин);
- докрасить препарат нейтральротом в течение 15 с, промыть.

Включения поли-В-оксимасляной кислоты выглядят как чёрно-синие гранулы в розовой цитоплазме клеток.

2. Выявление волютина:

- фиксированный мазок окрасить карболовым фуксином Циля в течение 1 мин;
- краситель смыть;
- препарат обесцветить 1 %-ным раствором серной кислоты в течение 20 – 30 с, промыть водой;
- препарат докрасить метиленовым синим (1:40) в течение 20 – 30 с, промыть водой.

Гранулы волютина окрашены в красный цвет на фоне синей цитоплазмы.

3. Выявление гликогена:

На предметное стекло нанести каплю суспензии дрожжей, добавить к ней такую же каплю раствора Люголя. Сверху накрыть покровным стеклом. Включения гликогена окрашены в ярко-желтый или коричнево-желтый цвет.

Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского

Оглавление

Введение	3
Задача № 1 Бактериологическое исследование пищевых продуктов	4
Задача № 2 Бактериологическая оценка качества воды	9
Задача № 3 Санитарно-микробиологическое исследование воды	16
Задача № 4 Изучение нормальной микрофлоры кожи	20
Задача № 5 Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам	21
Задача № 6 Изучение процесса спиртового брожения и его возбудителей	27
Задача № 7 Микробиологическое исследование молока	31
Задача № 8 Выделение молочнокислых бактерий и получение на их основе кисломолочных продуктов	35
Задача № 9 Поиск штаммов микроорганизмов продуцентов антибиотиков	38
Задача № 10 Использование азотфиксирующих микроорганизмов в качестве основы биоудобрений	42
Задача № 11 Получение накопительных культур микроорганизмов, устойчивых к ксенобиотикам и изучение их деструктивных свойств	50
Задача № 12 Влияние некоторых физико-химических факторов на процесс спорообразования у бацилл	59
Задача № 13 Изучение явления бактериоциногении	63
Задача № 14 Изучение действия ультрафиолетовых лучей на бактериальные клетки	67
Задача № 15 Изучение явления лизогении	71
Содержание дисциплины	75
Вопросы для текущего контроля	77
Приложение 1	82
Приложение 2	83