

МГПУ им. И. П. Шамякина

**СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ**



ISBN 978-985-477-888-4



9 789854 778884

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Мозырский государственный педагогический университет
имени И. П. Шамякина»

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

В двух частях

Часть 1

Мозырь
МГПУ им. И. П. Шамякина
2023

УДК 579.2(078)
ББК 28.4я73
С74

Составители:

В. В. Малащенко, магистр биологических наук, преподаватель кафедры биологии и химии УО МГПУ им. И. П. Шамякина;

С. М. Мижуй, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры биологии и химии УО МГПУ им. И. П. Шамякина

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной экологии наземных позвоночных и управления биоресурсами ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»

И. А. Крищук;

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии УО «Полесский государственный университет»

М. М. Воробьева

Печатается по решению редакционно-издательского совета учреждения образования «Мозырский государственный педагогический университет им. И. П. Шамякина»

Справочные материалы по микробиологии. В 2 ч. Ч. 1. / сост.:
С74 В. В. Малащенко, С. М. Мижуй. – Мозырь : МГПУ им. И. П. Шамякина, 2023. – 44 с.

ISBN978-985-477-888-4.

В справочных материалах рассмотрены следующие вопросы: морфологические и культуральные признаки микроорганизмов, правила работы в асептических условиях с микроорганизмами, подготовка образцов, микроскопирование препаратов микроорганизмов, приготовление, стерилизация питательных сред и выращивание микроорганизмов, освоение классических и современных методов исследования микроорганизмов, получение чистых культур микроорганизмов.

Предназначены для студентов очной (дневной) формы получения высшего образования, обучающихся по специальностям 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» и 1-02 04 01 «Биология и химия», при подготовке к лабораторным занятиям по дисциплине «Микробиология».

УДК 579.2(078)

ББК 28.4я73

ISBN978-985-477-888-4

© Малащенко В. В., Мижуй С. М.,
составление, 2023

© УО МГПУ им. И. П. Шамякина, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	4
Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории.....	5
Микроскопическая техника в микробиологии. Основные типы микроскопирования.....	6
Методы исследования микроорганизмов. Приготовление микробиологических препаратов.....	13
Приготовление и стерилизация питательных сред, посуды для проведения микробиологического анализа.....	18
Морфологические формы бактерий. Сложные и дифференциальные методы окраски бактерий.....	25
Морфологические и культуральные признаки микроскопических грибов и дрожжей.....	31
Получение чистых культур микроорганизмов. Определение и описание колоний, выросших в чашках Петри.....	36
Список использованной и рекомендуемой литературы.....	41
Словарь микробиологических терминов (глоссарий).....	42

ПРЕДИСЛОВИЕ

Микробиология является одной из важнейших фундаментальных дисциплин в системе биологического образования. Изучение микробиологии направлено на расширение и углубление научного кругозора студентов, получение знаний, необходимых для последующей практической деятельности.

Объектом изучения микробиологии являются микроорганизмы различных систематических категорий. В самом общем смысле в это понятие включаются бактерии, археи, вирусы, микроскопические водоросли, грибы и простейшие. В более узком смысле микробиология занимается изучением бактерий и архей, так как остальные микроорганизмы являются объектом интереса вирусологии, альгологии, микологии и т. д.

Микроорганизмы оказывают значительное влияние на биосферу в целом. В первую очередь они выступают в качестве незаменимого элемента биогеохимических циклов. Такие процессы, как, например, азотфиксация, разложение сложных растительных полимеров (лигнина, целлюлозы, суберина, пектина), могут осуществляться исключительно микроорганизмами. Они играют существенную роль в формировании и развитии природных сообществ. Именно микроорганизмы, которые первыми освоили кислородный фотосинтез, задали тенденцию эволюции всему остальному живому миру. Велико значение микроорганизмов и для человека. Впервые человечество начало использовать их для своих целей за тысячелетия до обнаружения самих микроорганизмов в приготовлении хлеба и производстве алкогольных напитков. Помимо этого, микроорганизмы являются возбудителями инфекционных заболеваний, продуцентами в биотехнологии, что делает их важными и интересными объектами научных исследований.

В справочных материалах рассмотрены морфологические и культуральные признаки микроорганизмов, правила работы в асептических условиях с микроорганизмами, подготовки образцов, микроскопирования препаратов микроорганизмов, приготовление, стерилизация питательных сред и выращивание микроорганизмов, освоение классических и современных методов исследования микроорганизмов, получение чистых культур микроорганизмов.

Предназначены справочные материалы для студентов очной (дневной) формы получения высшего образования, обучающихся по специальностям 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» и 1-02 04 01 «Биология и химия», при подготовке к лабораторным занятиям по дисциплине «Микробиология».

Составители издания выражают огромную благодарность рецензентам и коллегам, оказавшим помощь при подготовке справочных материалов.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

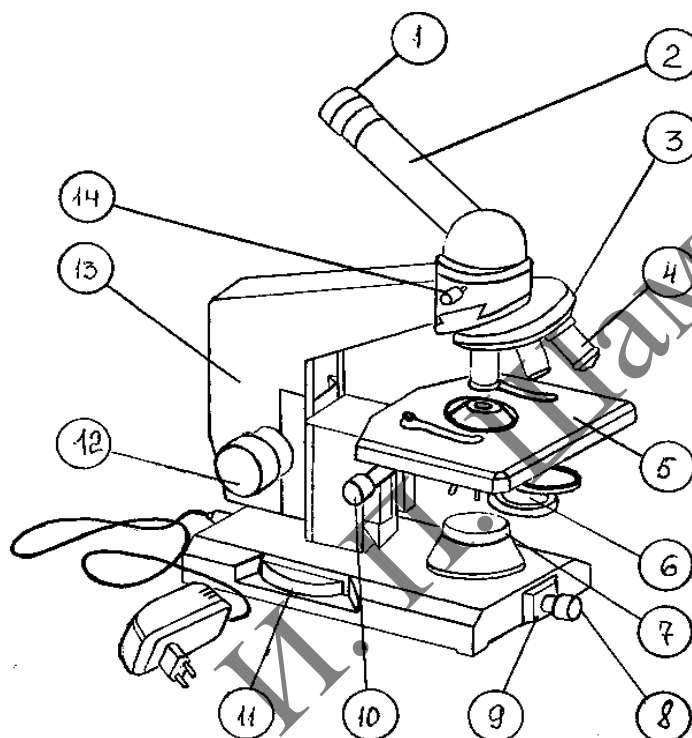
1. К работе в учебной микробиологической лаборатории допускаются лица после прохождения инструктажа по технике безопасности.
2. Запрещается входить в микробиологическую лабораторию в верхней одежде.
3. К занятию допускаются студенты только при наличии медицинского халата.
4. В микробиологическую лабораторию запрещено приносить пищу, питьевую воду, посторонние вещи. В лаборатории запрещается курить и принимать пищу.
5. К выполнению лабораторной работы можно приступать только после проведения инструктажа по технике безопасности, ознакомления с методиками с разрешения преподавателя. Перемещаться по лаборатории во время проведения занятия можно только с разрешения преподавателя.
6. На рабочем месте размещаются только необходимые для выполнения конкретной лабораторной работы оборудование и материалы.
7. При работе с микроорганизмами следует соблюдать осторожность и придерживаться приемов, исключающих возможность инфицирования.
8. Запрещается прикасаться к микробным культурам руками.
9. При случайном попадании биологического материала на стол, руки или другие поверхности необходимо сразу же оповестить об этом преподавателя и провести обработку загрязненной поверхности или рук дезинфицирующим раствором.
10. При проведении работы следует пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отбора объемов реактивов нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); нельзя выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость.
11. Если в ходе опыта требуется нагревание, то нужно соблюдать предусмотренные методическими указаниями способы нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на спиртовке.
12. Нельзя зажигать одну спиртовку от другой. Нельзя закрывать фитиль спиртовки колпачком между использованиями.
13. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: вымыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы, халат сложить в полиэтиленовый пакет, тщательно вымыть руки и обработать ватным тампоном с дезинфицирующим раствором.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА В МИКРОБИОЛОГИИ. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Устройство микроскопа и правила работы с ним

Микроскоп (от греч. *micros* – малый и *scopio* – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной.

Схема светового биологического микроскопа представлена на рисунке 1.



1 – окуляр; 2 – монокулярная насадка (тубус); 3 – револьверное устройство;
4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – корпус коллекторной линзы;
8 – патрон с лампой; 9 – шарнир; 10 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора;
11 – рукоятка тонкой фокусировки (микрометрический винт); 12 – рукоятка грубой
фокусировки (макрометрический винт); 13 – тубусодержатель;
14 – винт для крепления насадки

Рисунок 1 – Схема устройства светового биологического микроскопа

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

Тубус (№ 2 на рисунке 1) – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т. е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик (№ 5 на рисунке 1) служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения.

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т. е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно: допустимо вращение микровинта не более чем на 180 °С в ту или иную сторону.

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

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

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

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или x100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*.

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

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

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

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

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

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

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

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

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3–5 см от края стола.
2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение.
3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.
4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро- и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки

до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов.

5. Во время микрофотографирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно.

6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

Виды микроскопии

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

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

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

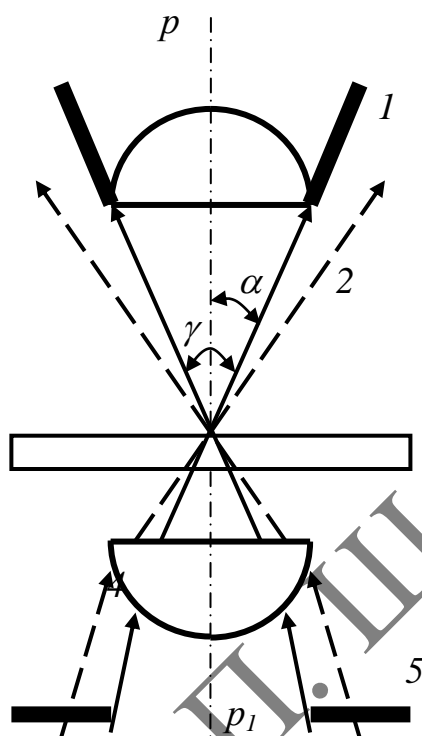
$$d = \lambda / 2 n \sin \alpha,$$

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

λ – длина волны света, проходящего через исследуемый объект;

$n \sin \alpha$ – числовая апертура, где n – показатель преломления светом оптической среды, α – апертурный угол объектива.

На рисунке 2 представлена схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла микроскопа (стрелками обозначен ход световых лучей).



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

Рисунок 2 – Схема, иллюстрирующая понятие апертурного угла

Э. Аббе доказал, что нет смысла беспредельно повышать увеличение светового микроскопа. Минимальное расстояние между двумя точками при освещении объекта светом с длиной волны 550 нм, к которому наиболее чувствителен глаз, при использовании микроскопа, апертурный угол которого 90° (это предельный угол, для которого $\sin \alpha = 1$), для сухой системы составляет около 300 нм, а для иммерсионной системы – около 200 нм.

Таким образом, повысить разрешающую способность микроскопа можно путем:

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

Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный конденсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный

пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

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

Фазово-контрастная микроскопия

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

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

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

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

Люминесцентная микроскопия

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

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

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

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

Электронная микроскопия

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

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

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

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Препараты (мазки) готовят из бактериальных культур. *Чистая бактериальная культура* – это культура, состоящая из микробных клеток одного вида. По способу получения она представляет собой потомство (клон) одной клетки.

В лаборатории микроорганизмы выращивают в питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы и чашки Петри. Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется инокуляцией (посевом). Перед посевом следует надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают маркером на стекле или на наклеенной этикетке. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей, если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, когда пересевают культуры микроорганизмов, выросшие в жидкой питательной среде, пользуются стерильной пипеткой. Использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, не касаясь ею окружающих предметов.

При приготовлении препаратов из культуры бактерий, выросших на питательных средах, необходимо соблюдать правила *асептики*.

АЛГОРИТМ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МАЗКА

из бактериальной культуры, выращенной на скошенном агаре («косяке»).

1. Предметное стекло аккуратно берут за ребро и наносят номер или наименование бактериальной культуры.
2. Зажигают спиртовку.
3. Фламбируют (обжигают пламенем) поверхность стекла, где будет располагаться мазок.
4. Стекло помещают вблизи спиртовки на чашку Петри.
5. На предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды.
6. В левую руку берут пробирку с культурой и помещают между 1 и 2 пальцами таким образом, чтобы ладонь находилась под пробиркой и горлышко пробирки было направлено в зону спиртовки.
7. В правую руку берут бактериологическую петлю как карандаш.
8. Петлю фламбируют до покраснения сначала горизонтально, затем вертикально (1).
9. Не выпуская петли, мизинцем правой руки прижимают пробку пробирки к ладони (2) и осторожно вынимают ее из пробирки. Движения должны быть плавными.
10. Горло пробирки обжигают (3).
11. Вводят в пробирку петлю, охлаждая ее о стенки пробирки (4).
12. Осторожно закрывают и захватывают петлей культуру, не повреждая агара, и вынимают петлю, не касаясь ею стенок пробирки (5).

13. Прожигают горло пробирки и пробку в пламени, одновременно. Закрывают пробирку (6).

14. Петлю с культурой вносят в каплю дистиллированной воды и осторожно эмульгируют, не заходя за границы мазка (7).

15. Бактериологическую петлю с остатками культуры прожигают до покраснения в пламени спиртовки (8).

16. Пробирку с культурой и петлю ставят в штатив.

17. Приготовленный мазок высушивают либо на воздухе, либо высоко над пламенем спиртовки (рисунок 3).

Примечание:

1. Приготовление мазка из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, не требует использования дистиллированной воды или физиологического раствора.

2. При приготовлении мазка из культуры, выросшей на чашке Петри, необходимо:

- отметить изолированную колонию со стороны дна чашки;
- чашку берут в левую руку и в сторону спиртовки приоткрывают крышку, придерживая ее 1 и 2 пальцами левой руки;
- прокаленную петлю вводят под крышку чашки, остужая ее о край среды;
- осторожно откалывают часть выделенной колонии и, не задевая края чашки, выносят на стекло с дистиллированной водой;
- дальнейшие манипуляции осуществляются согласно общему алгоритму.

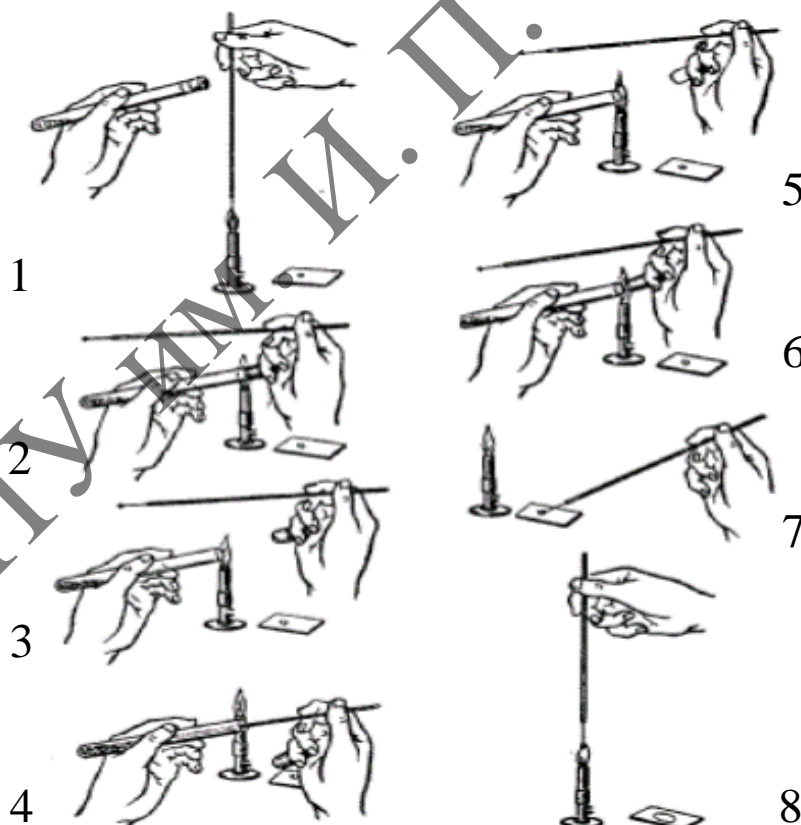
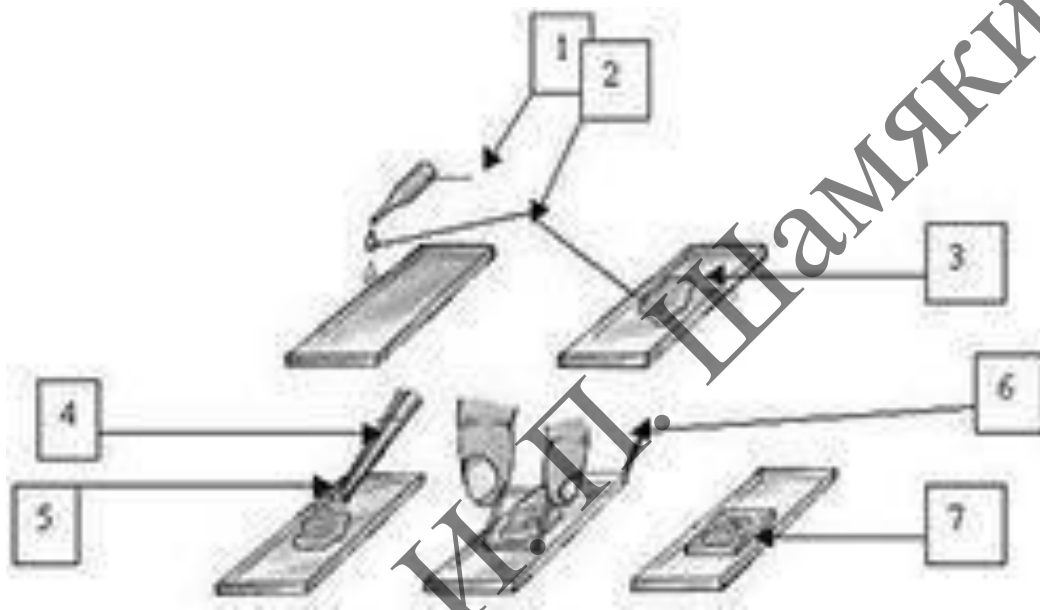


Рисунок 3 – Алгоритм приготовления мазка

Для приготовления прижизненных бактериальных препаратов используются методы раздавленной и висячей капли.

МЕТОД РАЗДАВЛЕННОЙ КАПЛИ

1. На середину чистого, обезжиренного предметного стекла наносят бактериологической петлей каплю физиологического раствора.
2. В каплю воды вносят небольшое количество бактериальной культуры.
3. Осторожно накрывают покровным стеклом, предварительно поставив его на ребро. Капля тонким слоем заполняет пространство между покровным и предметным стеклом (рисунок 4).



с помощью пипетки (1) капля воды (2) наносится на середину чистого обезжиренного стекла (3), куда с помощью бактериологической петли (4) вносят культуру микроорганизмов (5), не допуская растекания жидкости (6), каплю осторожно накрывают покровным стеклом (7)

Рисунок 4 – Приготовление препарата методом раздавленной капли

МЕТОД ВИСЯЧЕЙ КАПЛИ

1. На чистое покровное стекло наносят каплю физиологического раствора.
2. Культуру микроорганизмов наносят бактериологической петлей на покровное стекло.
3. Берут предметное стекло с лункой и, обезжирив его, наносят тонкий слой вазелина по краю лунки с помощью зубочистки или стеклянной палочки.
4. Предметное стекло с лункой накладывают на покровное стекло с бактериальной культурой.

5. Аккуратно переворачивают мазок покровным стеклом вверх и препарат помещают на предметный столик. Капля свободно висит в луночке и долго не высыхает, что позволяет длительное время наблюдать за подвижностью микробных клеток.

Приготовление препаратов фиксированных клеток

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура.

Для получения фиксированных препаратов важно правильно подготовить предметные стекла. Они должны быть чистыми и тщательно обезжиренными. Для этого стекла, бывшие в употреблении, выдерживают 1–2 часа в хромовой смеси (в 1 л воды вносят 50 г бихромата калия и 100 г технической серной кислоты), после чего ополаскивают теплой водой и спиртом. Можно также кипятить стекла в течение 15 мин. в растворе соды или мыльной воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды. При достаточном обезжиривании капля растекается равномерно и не собирается в выпуклые, медленно высыхающие пузырьки. Берут стекла пинцетом или аккуратно за грани, так как пальцы оставляют на поверхности жирные пятна.

Приготовление фиксированных препаратов ведут в следующей последовательности:

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

2. Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе.

3. Производят фиксацию мазка. Для этого стекло с высохшим мазком проводят 3–4 раза над пламенем горелки той стороной, где мазок отсутствует. Цель фиксации:

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

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

Помимо термической обработки, применяют также фиксацию химическими веществами: погружают предметное стекло с мазком в мензурку с 96- процентным этанолом на 15–20 мин. с ацетоном – на 5 мин. со смесью 96- процентного этанола и 40- процентного формалина соотношение 95:5 – на 2 мин. и др.

Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Фиксированные препараты нельзя рассмотреть под микроскопом, так как они являются бесцветными и пропускают световые лучи. Поэтому их окрашивают, используя простые или сложные методы.

При окрашивании фиксированных мазков простыми методами используют один краситель (фуксин, краска Муромцева, генцианвиолет, метиленовая синь и др.).

Последовательность окрашивания мазка простыми методами следующая:

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он покрывал всю поверхность мазка, и выдерживают в течение определенного времени. Так, при окраске фуксином на мазок наносят несколько капель красителя и выдерживают его на мазке 2–3 мин. При окрашивании препарата из кефира на него краску Муромцева наносят на мазок через полоску фильтровальной бумаги на 3–5 мин.

2. Краску смывают с мазка слабой струей до бесцветной смывной воды. При этом стекло держат в наклонном положении над лотком.

3. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой, которую осторожно прикладывают к стеклу, и досушивают на воздухе.

4. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом $\times 90$ или $\times 100$.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПОСУДЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Разнообразные питательные вещества, в которых нуждаются микроорганизмы и которые используются ими для синтеза основных компонентов клетки, роста, размножения и для получения энергии, называются *питательными веществами*, а среда, содержащая питательные вещества, является *питательной средой*.

По типу питания микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, относятся к *хемоорганогетеротрофам*. Это значит, что органические вещества, содержащиеся в питательной среде, являются источником углерода, энергии и электронов. Потребности микроорганизмов в тех или иных органических веществах зависят от их видовой принадлежности, и, следовательно, от наличия в клетках и активности соответствующих ферментных систем.

В качестве *источника углерода* микроорганизмы используют углеводы, органические и аминокислоты, спирты, липиды и т. д. Как правило, лучше усваиваются низкомолекулярные органические соединения. Высокомолекулярные органические вещества могут быть использованы для питания только теми микроорганизмами, которые способны синтезировать соответствующие гидролитические экзоферменты. Органические вещества и вода являются также основными источниками водорода и кислорода.

Источником азота для хемоорганогетеротрофов могут быть различные органические и минеральные соединения: белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты.

В среде обязательно должны присутствовать *макроэлементы* (P, S, Ca, Mg, K, Fe, Na, Cl), которые вносятся в питательную среду в виде катионов питательных солей.

Микроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, так как большинство микроэлементов является примесью солей макроэлементов или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах *факторы роста*. Факторы роста обязательно вносят в среды для культивирования *ауксотрофных микроорганизмов* (микроорганизмов, которые не способны синтезировать сами те или иные органические вещества, необходимые для роста и развития), а также добавляют в питательные среды в малых количествах для ускорения роста микроорганизмов, способных эти вещества синтезировать самостоятельно. К факторам роста относятся отдельные аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты, витамины и др., а также природные субстраты, содержащие эти соединения (морковный сок, кукурузный экстракт, автолизат дрожжей, гидролизаты растительного сырья и т. д.).

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест обитания, получения накопительных и чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность для количественного учета микроорганизмов в различных объектах (в пищевых продуктах, в воздухе, в воде, почве). С помощью питательных сред получают также биомассу полезных для народного хозяйства микроорганизмов и биологически активные целевые продукты.

Классификация питательных сред

По *консистенции* питательные среды делятся на жидкие, плотные и сыпучие.

Жидкие среды применяются для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов, для обновления долго хранящихся культур, для поддержания и хранения тех чистых культур, которые плохо растут на плотных средах.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культуральных свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированные колонии (*колония* – популяция микроорганизмов, выросших из одной клетки). Плотные питательные среды используются также для количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, других объектах внешней среды и для хранения чистых культур.

Плотные среды готовятся из жидких путем добавления гелеобразующих веществ: агар-агара, желатина, геля кремнекислого (силикагеля).

Лучшим гелеобразующим веществом является *агар-агар*, получаемый из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления 96–100 °С и температурой застывания около 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать почти все микроорганизмы. Кроме того, агар-агар очень редко используется микроорганизмами в качестве питательного субстрата. Для уплотнения жидкой среды в нее вносят в зависимости от степени очистки от 1,5 до 2,5 % агар-агара.

В отличие от агар-агара *желатин* – это вещество белковой природы, которое получается из костей и хрящей животных при их вываривании, поэтому многие микроорганизмы используют желатин в качестве питательного субстрата, и к концу культивирования среда с желатином разжижается. Ограниченное использование желатина в качестве уплотнителя для плотных питательных сред связано также с тем, что по сравнению с агар-агаром он образует менее прочный гель, который плавится при 23–25 °С и застывает при 20 °С, в то время как большинство микроорганизмов развивается при температуре от 25 до 37 °С.

Если требуется получить плотные среды, не содержащие органические компоненты, или синтетические среды с определенным количественным и качественным составом, то в качестве уплотнителя применяют кремне-

вокислый гель. Получают его путем смешивания равных объемов соляной кислоты с удельной массой 1,1 и жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) с последующей разливкой по 25–30 мл в чашки Петри и выдержкой 1–2 ч.

Сыпучие среды применяют в основном в промышленной микробиологии. К таким средам относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, смоченный питательным раствором. Такие среды используются для культивирования аэробных микроорганизмов.

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

Натуральные среды готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав. Натуральные среды используют для выращивания микроорганизмов, накопления биомассы, хранения чистых культур, но они мало пригодны для изучения обменных процессов микроорганизмов. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, различные экстракты, мясной бульон, автолизат дрожжей, молоко, молочная сыворотка, гидролизаты из растительного сырья и т. д. Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также не охмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях. По набору компонентов синтетические питательные среды могут быть сложными (среды для выращивания молочнокислых бактерий) и довольно простыми. Такие среды применяются для исследования обмена веществ, выяснения закономерностей роста или биосинтеза какого-либо метаболита и т. д. Наиболее часто в практической работе используют синтетическую среду Чапека для выращивания грибов и среду Ридера для дрожжей. Основным недостатком синтетических сред является то, что на таких средах микроорганизмы очень долго растут.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов. Цель использования полусинтетических сред та же, что и синтетических. Так как натуральные компоненты вносятся в небольших количествах, то их химический состав не учитывается при изучении обменных процессов тех или иных микроорганизмов.

По назначению среды делятся на универсальные (основные), избирательные (накопительные, селективные) и дифференциально-диагностические.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов. К универсальным средам, используемым для выращивания бактерий, относятся мясопептонный агар и бульон (МПА, МПБ), среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ). Грибы и дрожжи хорошо растут на не охмеленном пивном сусле, сусло-агаре (СА), среде Сабуро.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. Избирательные среды применяют для выделения определенных микроорганизмов из мест их естественного обитания и для получения накопительных культур. В качестве накопительных питательных используют, например, жидкие среды Кесслера (используется для накопления бактерий группы кишечной палочки), Мюллера и Кауфмана (для выявления сальмонелл). Элективными средами могут быть такие плотные питательные среды, как молочно-солевой агар (МСА) и желточно-солевой агар (ЖСА) – для выявления и количественного учета в пищевых продуктах коагулазоположительных стафилококков, кровяной агар – для выявления гемолитических стрептококков, агар с гидролизованным молоком и мелом – для количественного учета молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма. Примером таких сред является плотная среда Эндо, применяемая для определения бактерий группы кишечной палочки, в состав которой входит лактоза, насыщенный спиртовой раствор фуксина, обесцвеченного перед добавлением в среду 10- процентным водным раствором сульфата натрия (образуется бесцветная фуксин-сернистая кислота). Кишечная палочка на такой среде ферментирует лактозу с образованием альдегидов, вследствие чего бесцветная фуксин-сернистая кислота переходит в фуксин-сернистое соединение с образованием фуксина, который окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет с металлическим блеском.

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. *В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы.*

2. *Среда должна быть сбалансирована по химическому составу.* Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органических элементов – С:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке.

3. *Среды должны иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку.* Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. *Среда должна иметь определенное значение рН среды.* Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с рН около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. рН является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения рН в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), CaCO_3 (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например, аминокислоты, полипептиды, белки) и др.

5. *Среды должны быть изотоничными* для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. *Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (rh_2)*, определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $rh_2 = 41$, насыщенный водородом – $rh_2 = 0$. Облигатные анаэробы размножаются при rh_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Методы стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря

Стерилизацией или обеспложиванием (*sterilis* – бесплодный) называется полное уничтожение микроорганизмов в питательных средах, посуде и других объектах.

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры, патогенной и непатогенной, присутствующей в данном объекте. Она не должна приводить к порче материала или изменению его физического или химического состояния. Поэтому в зависимости от физических свойств стерилизуемых объектов и цели стерилизации применяют различные методы обеспложивания: горячие (влажная, дробная, сухая стерилизация) и холодные (механическая стерилизация, ионизация, стерилизация ультразвуком, ультрафиолетовыми лучами). Основное значение имеет тепловое воздействие на объект.

Методы, основанные на термической обработке стерилизуемых объектов

Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов.

Различают *влажные и сухие способы тепловой стерилизации*.

Влажные способы используются, главным образом, для стерилизации питательных сред. К таким способам относятся стерилизация паром под давлением, стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) и тиндализация.

Стерилизация паром под давлением – самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации питательных сред и посуды, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении воды пар не выходит наружу, а, скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. При создании избыточного давления возрастает температура кипения воды и температура пара. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в паровых стерилизаторах.

Стерилизация текучим паром используется для сред, которые нельзя нагревать выше температуры 100 °С. Стерилизация проводится при 100 °С (температура парообразования) по 30–60 минут в течение 3 дней с промежутками в 18–20 часов, во время которых материал выдерживается в термостате или при комнатной температуре. Поэтому этот способ называют еще дробной стерилизацией. В основу способа дробной стерилизации положен следующий принцип: при нагревании до 100 °С в течение 30–60 минут погибают все вегетативные клетки, а споры остаются жизнеспособными. В промежутке между стерилизацией споры прорастают в вегетативные клетки. Через сутки проводят повторную стерилизацию. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта. Стерилизацию текучим паром осуществляют в аппаратах Коха или текучепаровых аппаратах (кипятильниках Коха).

Тиндализация – это дробная стерилизация при низкой температуре – 56–58 °С. Применяют этот способ при стерилизации сред, которые нельзя нагревать до 100 °С. Такие среды подвергают нагреванию в течение 5–6 дней подряд по 1 часу ежедневно (в 1-й день – в течение 2 часов). В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях.

Сухие способы. При работе в микробиологической лаборатории из сухих способов термической стерилизации используются следующие:

прокаливание на огне (фламбирование) – очень быстрый и надежный способ стерилизации бактериологических петель, препаровальных игл перед посевами. Этим способом можно стерилизовать также мелкие металлические предметы (пинцеты, скальпели) и предметные стекла. Осуществляют прокаливание над пламенем горелки;

стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) используется для стерилизации микробиологической посуды (пипеток, чашек Петри), песка. Осуществляют стерилизацию сухим жаром при температуре 150–170 °С в течение 1...1,5 часов в печах Пастера или в сушильных шкафах.

Методы холодной стерилизации

Механическая стерилизация (фильтрование). Этот способ применяется для стерилизации сред в тех случаях, когда их нельзя подвергать нагреванию. При механической стерилизации стерилизуемые жидкости фильтруют через

специальные фильтровальные приборы, которые имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микробы. Для фильтрации в микробиологической практике применяют различные фильтровальные приборы (фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, Мандлера, Беркефельда и др.).

Химическая стерилизация. Этот вид стерилизации в практике приготовления питательных сред имеет ограниченное применение. В лабораторной практике для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред используют такие химические вещества, как толуол, хлороформ, эфир и другие. Для освобождения от консерванта среду нагревают на водяной бане при 56 °С.

Химическая стерилизация используется также для дезинфекции оборудования, помещений, использованной посуды и отработанного микробиологического материала. В качестве дезинфицирующих веществ широкое применение нашли химические соединения, содержащие активный хлор (хлорамин, хлорная известь).

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Этот способ стерилизации используется для стерилизации воздуха в микробиологическом боксе и в лаборатории перед проведением микробиологических исследований. Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами проводят с помощью бактерицидных ламп.

Приготовление посуды для проведения микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично улаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30–40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу либо печи Пастера при 165–170 °С в течение 1–1,5 часов.

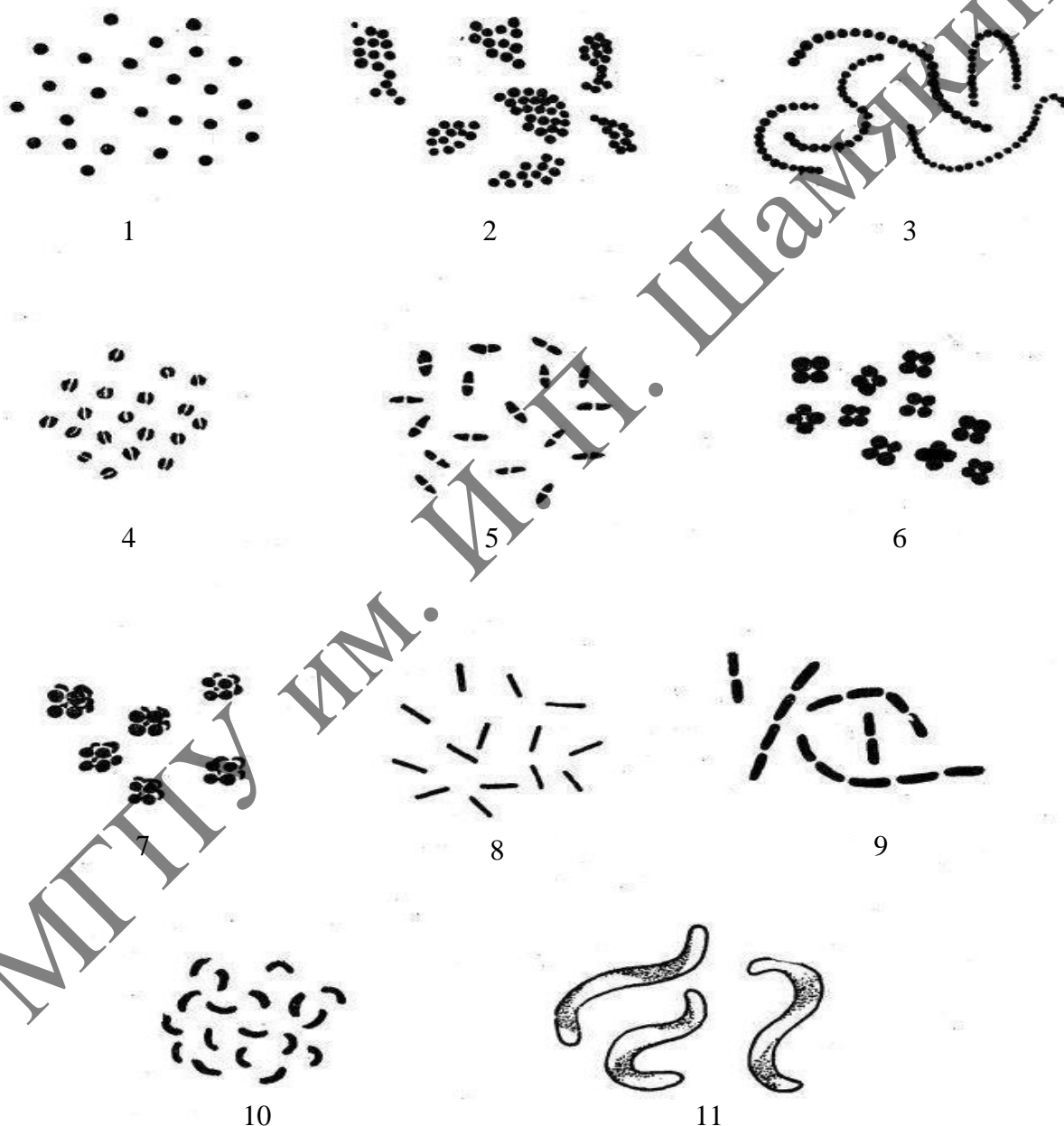
Стерильную посуду следует хранить в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками в течение не более 30 суток.

Приготовление питательных сред из промышленно выпускаемых сухих сред

Заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками. Далее среды стерилизуют в автоклаве. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильный аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ. СЛОЖНЫЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

К морфологическим свойствам бактерий относятся не только форма, но и размер клеток, расположение клеток в пространстве, наличие спор и капсул, подвижность и характер окраски бактерий по Граму. Наиболее типична морфология бактерий в молодых культурах. Среди основных *морфологических форм бактерий* различают (рисунок 5):

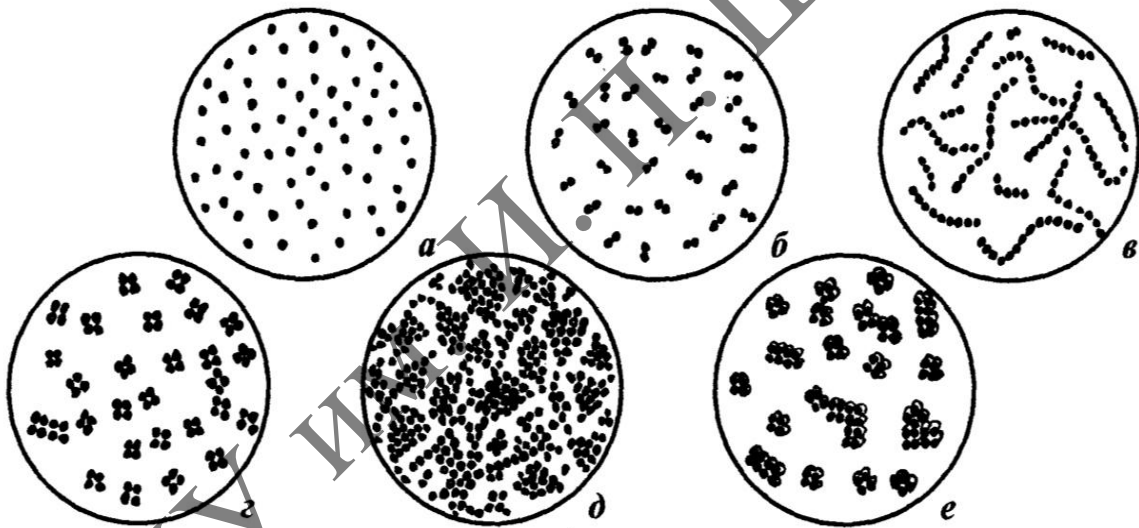


1 – микрококки; 2 – стафилококки; 3 – стрептококки; 4 – гонококки; 5 – пневмококки;
6 – тетракокки; 7 – сарцины; 8, 9 – различные формы палочек;
10 – вибрионы; 11 – спириллы

Рисунок 5 – Основные формы бактерий

1. Шаровидные (кокковые), которые по характеру взаиморасположения делятся на:

- ✓ микрококки (лат. *micro* – маленький). В природе встречаются в виде одиночных шаровидных клеток;
- ✓ диплококки (лат. *diploos* – двойной) – бактерии, соединенные по две клетки;
- ✓ тетракокки (лат. *tetra* – четыре) – группируются по четыре клетки;
- ✓ стрептококки (лат. *streptos* – цепь) – бактерии, образующие в результате деления клеток в одной плоскости разнообразной длины цепочки;
- ✓ сарцины (лат. *sarceo* – соединяю) – шаровидные бактерии, группирующиеся по 8 клеток. Располагаются они в виде куба, с каждой стороны которого по 4 клетки. Такая форма возникает в результате деления клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях (рисунок б);
- ✓ стафилококки (лат. *staphylo* – гроздь) – клетки вследствие беспорядочного деления образуют скопления, напоминающие по внешнему виду гроздь винограда.



а – микрококки; б – диплококки; в – стрептококки; г – тетракокки;
д – стафилококки; е – сарцины

Рисунок б – Взаимные расположения кокков

2. Палочковидные, которые различаются по форме:

- ✓ правильная (энтеробактерии (представители семейства Enterobacteriaceae), псевдомонады (род *Pseudomonas*));
 - ✓ неправильная (коринебактерии (*Corynebacterium*));
- по размеру:
- ✓ мелкие (бруцеллы (*Brucella*), бордетеллы (*Bordetella*));
 - ✓ средние (бактероиды (*Bacteroides*), кишечная палочка (*E.coli*));
 - ✓ крупные (бациллы (*Bacillus*), клостридии (*Clostridium*));

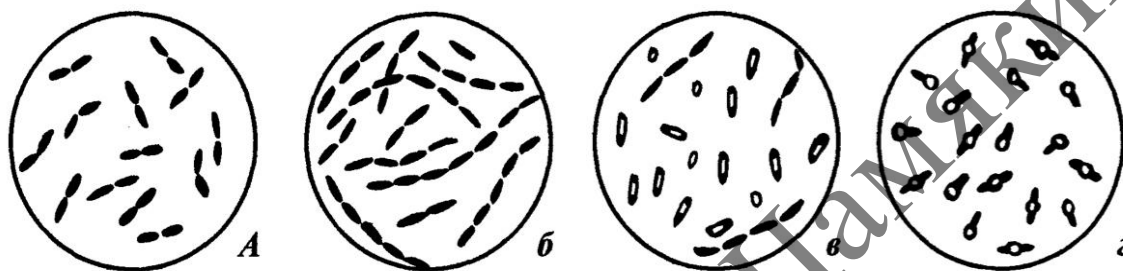
по форме концов:

- ✓ обрубленные (бациллы);
- ✓ закругленные (сальмонеллы, псевдомонады);
- ✓ заостренные (фузобактерии); утолщенные (коринебактерии);

по характеру взаиморасположения все палочки делятся на:

- ✓ расположенные одиночно;
- ✓ диплобактерии и диплобациллы (сцепленные попарно);
- ✓ стрептобактерии и стрептобациллы (сцепленные в цепочку)

(рисунок 7).



а – диплобактерии; б – стрептобактерии; в – бациллы; г – клостридии

Рисунок 7 – Морфология палочковидных бактерий

3. Извитые формы – по характеру и количеству завитков они делятся на:

- ✓ вибрионы (слегка изогнутые палочки или неполные завитки);
- ✓ спириллы (один или несколько завитков);
- ✓ спирохеты, которые в свою очередь, делятся на:
 - лептоспиры (завитки с загнутыми крючкообразными концами – S-образная форма);
 - боррелии (4 – 12 неправильных завитков);
 - трепонемы (14 – 17 равномерных мелких завитков).

4. Нитчатые формы, к которым относят актиномицеты (*Actinomycetales*).

Клетки актиномицетов обычно имеют вид длинных и ветвящихся нитей, напоминающих в ряде случаев мицелий одноклеточных грибов. Нити мицелия имеют длину 100–600 мкм и толщину 0,2–1,2 мкм.

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

Сложные и дифференциальные методы окраски бактерий

Различают простые, сложные и дифференциальные методы окраски бактерий. При простой окраске используют один краситель и прокрашивают всю клетку.

Сложное окрашивание предусматривает применение двух или нескольких красителей (например, при определении отношения бактерий к окраске по Граму).

Дифференциальное окрашивание основано на индивидуальном отношении биологических структур клетки к различным красителям (окраска спор, оболочки, капсул, метакроматина и др.). При этом так же, как и в сложных методах, как правило, используется несколько красителей.

Сложные методы окраски позволяют распределить бактерии на группы, что имеет важное диагностическое значение при их идентификации. Среди сложных методов наиболее широкое применение нашел метод окраски бактерий по Граму, позволяющий разделить бактерии в зависимости от химического состава и структуры клеточной стенки на две основные группы – грамположительные (грам +; G^+) и грамотрицательные (грам –; G^-). Грамположительные бактерии по этому методу окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый. К сложным методам относится и метод окраски по Цилю-Нильсену, позволяющий дифференцировать бактерии на две группы по кислотоустойчивости. Этот метод позволяет выявить туберкулезную палочку, бактерии паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота и другие кислотоустойчивые микроорганизмы.

При использовании **дифференциальных (специальных) методов** можно окрасить споры, определить наличие в клетках запасных питательных веществ, выявить клеточные структуры.

При окраске спор, например, можно использовать различные методы (методы Шеффера-Фултона, Пешкова, Златогорова, Меллера и др.), основанные на разрыхлении малопроницаемой для красителей оболочки спор различными способами (путем нагревания, обработки препарата кислотами, щелочами) с одновременным или дальнейшим их окрашиванием концентрированным красителем. После такой обработки препарат промывают водой (при этом клетки обесцвечиваются, а споры остаются окрашенными) и докрашивают вегетативные клетки красителем контрастного цвета.

Большое значение с диагностической точки зрения имеет окрашивание капсул. Капсульные вещества слабо окрашиваются и при простом методе окраски выступают в виде бледной каймы бесцветного или слабоокрашенного ореола вокруг микробной клетки. Для того чтобы лучше рассмотреть капсулы, используют методы Михина, Муромцева, Ольта, Бурри-Гинса и др. В этих методах используют один или несколько красителей. Так, для окраски капсул по Бурри-Гинсу суспензию слизеобразующих бактерий смешивают на краю предметного стекла с каплей туши и с помощью другого

предметного стекла распределяют тонким слоем по поверхности. Далее препарат фиксируют над пламенем горелки и окрашивают фуксином или сафранином. При микроскопии такого препарата на темном фоне отчетливо выделяются окрашенные в красный цвет бактерии, окруженные бесцветными капсулами.

Окраска бактерий по методу Грама

Сущность метода заключается в различии химического состава и строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грам+ бактерий толстая, но однослойная, содержит много пептидогликана – *муреина*, а также *тейховые кислоты*, которые образуют прочное соединение с красителями – генцианвиолетом и йодом и поэтому остаются окрашенными после обработки мазка спиртом. Таким образом, грам+ бактерии по методу Грама окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

У грам– бактерий клеточная стенка тонкая, но двухслойная. Муреина мало, причем он содержится во внутреннем слое клеточной стенки, тейхоевые кислоты отсутствуют. Внешний слой клеточной стенки содержит, главным образом, вещества, обладающие гидрофобными свойствами – *липополисахариды* и *липопротеиды*. Эти вещества не образуют прочного комплекса с красками генцианвиолетом и йодом, и поэтому клетки обесцвечиваются после обработки 96- процентным этиловым спиртом и после дополнительной окраски красителем фуксином окрашиваются в бледно-розовый цвет.

Техника окраски по Граму

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемой чистой культуры.

2. Мазок окрашивают красителем генцианвиолетом через полоску фильтровальной бумаги. Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1- процентным спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А. В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2–3 мин.

3. Фильтровальную бумагу снимают с мазка, краску сливают и наносят на мазок раствор Люголя на 2 мин.

4. Раствор Люголя сливают с мазка и обрабатывают 96- процентным спиртом в течение 30–60 сек. Затем препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

5. Мазок окрашивают красителем фуксином 2–3 мин. второй раз промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Затем на стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100 при максимальном освещении.

Окраска спор бактерий по Шефферу-Фултону

Сущность метода заключается в комбинированном действии концентрированного раствора красителя бриллиантового зеленого и температуры на малопроницаемую оболочку спор с дальнейшим обесцвечиванием цитоплазмы вегетативной клетки и ее контрастным докрашиванием сафранином. Таким образом, споры окрашиваются в зеленый цвет, а клетки – в красный.

Техника окраски по Шефферу-Фултону

1. На краю предметного стекла (на расстоянии примерно 1,5–2,0 см от края) готовят густой нефиксированный мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий.

2. На раствор наносят водный раствор бриллиантовой зелени и мазок с краской нагревают над пламенем горелки до появления пара. Нельзя допускать прикипания краски к мазку. Поэтому препарат периодически отстраняют от пламени. Нагревание мазка с краской проводят в течение 3 мин.

3. Краску сливают, препарат быстро промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

4. Окрашивают мазок раствором сафранина 2–3 мин. затем краску сливают, мазок вторично промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Далее на мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают под объективом на х90 или х100 при максимальном освещении.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ И ДРОЖЖЕЙ

Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых *гифами*. Диаметр гифов колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами), в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

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

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно – кусочком мицелия.

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

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

Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже – крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя *субстратный* мицелий, а другая часть гифов образует *воздушный* мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т. д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

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

Морфологические особенности грибов различных классов представлены на рисунке 8.

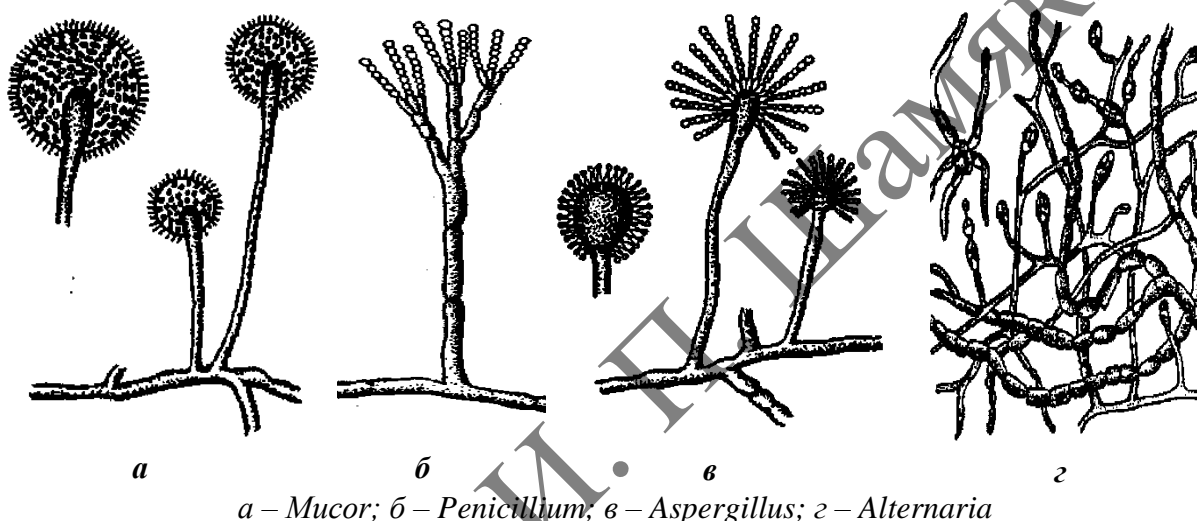


Рисунок 8 – Морфологические особенности грибов различных классов

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

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

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2–3 мкм) и сеп-

тированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «лечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же, как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение большого количества пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger* применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилолитических ферментов.

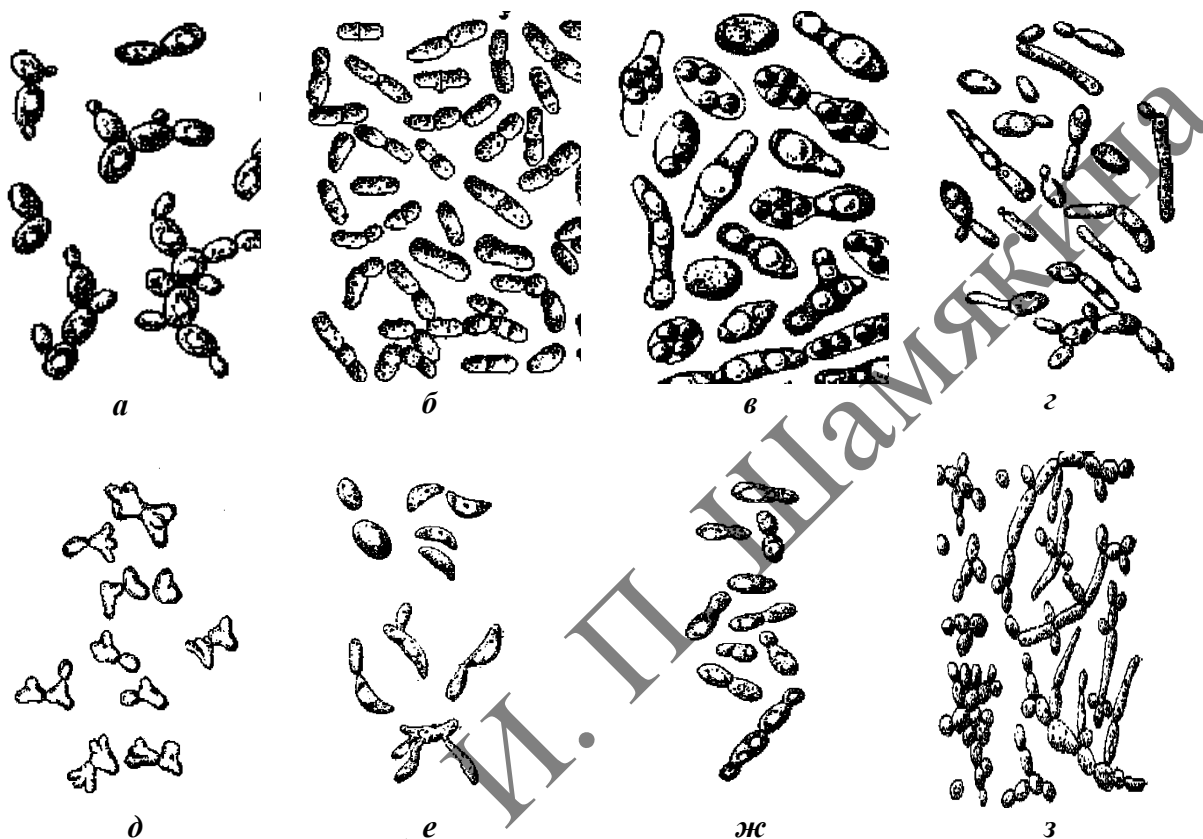
Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы. Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Морфология дрожжей и их характеристика

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

Дрожжи по отношению к кислороду делятся на факультативные анаэробы (в аэробных условиях осуществляют дыхание и активно накапливают биомассу, а в анаэробных условиях вызывают спиртовое брожение) и аэробы.

Морфологически дрожжи разнообразны. Они отличаются друг от друга размерами и формой клеток. Размеры клеток дрожжей в зависимости от вида варьируют в следующих пределах: от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. Морфологическое разнообразие форм дрожжей изображено на рисунке 9.



а – овальная яйцевидная; б – цилиндрическая; в – апикулятная; лимонovidная;
г – стреловидная; д – треугольная; е – серповидная; ж – колбовидная;
з – мицелиевидная

Рисунок 9 – Формы дрожжевых клеток

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

В зависимости от вида дрожжи вегетативно могут размножаться почкованием (так размножаются дрожжи овальной формы), бинарным делением (характерно для дрожжей цилиндрической или палочковидной формы) или почкующимся делением. Кроме вегетативного размножения, дрожжи – аскомицеты могут размножаться половым путем с образованием аскоспор.

Из дрожжей, относящихся к классу аскомицетов, большое значение имеют дрожжи-сахаромицеты рода *Saccharomyces*, которые широко используются в пищевой промышленности. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промыш-

ленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.

Некоторые спорогенные дрожжи являются *дикими дрожжами*. Эти дрожжи так же, как и культурные, способны осуществлять спиртовое брожение, но помимо спирта образуют много побочных продуктов (альдегиды, высшие спирты, эфиры и др.) и поэтому ухудшают органолептические показатели продукта. Эти дрожжи являются вредителями производства различных напитков (пива, вина, безалкогольных напитков), а также возбудителями порчи многих пищевых продуктов.

Дрожжи – дейтеромицеты могут размножаться только вегетативным способом. Некоторые из этих дрожжей (например, дрожжи рода *Candida*) используются в промышленности для получения кормового белка, органических кислот, витаминов и других продуктов микробного синтеза. Дрожжи вида *Torulopsis kefir* входят в состав симбиотической закваски – кефирного грибка. Другие представители несовершенных (аспорогенных) дрожжей являются дикими дрожжами и вызывают порчу многих пищевых продуктов.

К дрожжам–вредителям производства относятся дрожжи родов *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycoderma*, *Trichosporon* и др. Среди аспорогенных дрожжей встречаются *ложные дрожжи*, которые образуют псевдомицелий и растут на жидких субстратах в виде пленок.

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ КОЛОНИЙ, ВЫРОСШИХ В ЧАШКАХ ПЕТРИ

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах. При культивировании на питательных средах вырастают *культуры* микроорганизмов. *Рост культуры* – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистая культура – популяция микроорганизмов на питательной среде (жидкой или твердой), представленная клетками одного вида. Это основной тип культур, с которыми имеет дело микробиология. Они позволяют изучать морфологические, биохимические, генетические и другие свойства исключительно одного вида микроорганизмов, пусть даже понятие «вид» по отношению к бактериям является весьма расплывчатым. Чистые культуры – исключительно продукт деятельности человека, в естественных условиях они не встречаются. В любой экологической нише, будь то почва, водоем или какая-либо поверхность, существует несколько, а чаще всего огромное множество видов микроорганизмов. Процесс выделения чистых культур достаточно хорошо известен и рутинен для известных видов бактерий. При выделении чистой культуры из естественных условий необходимо пройти стадию накопительной культуры.

Накопительная культура – популяция нескольких видов микроорганизмов, выращенных в определенных селективных (селективных, накопительных) условиях. Селективные условия благоприятствуют существованию необходимой группы микроорганизмов и/или препятствуют росту остальных. Под селективными условиями в каждом конкретном случае понимается разное. Такими условиями могут быть в первую очередь источник углерода (CO₂ для автотрофов, C₁-соединения для метилотрофов), источник энергии (свет как единственный источник энергии для фотосинтетиков) и отношение к молекулярному кислороду (в присутствии кислорода будут развиваться только аэробы). Кроме этого, в качестве селективных факторов используются pH (молочнокислые бактерии могут расти и при pH = 4, уробактерии – при pH = 9), температура (для термофилов и спорообразующих бактерий), концентрации различных веществ в среде. Большое значение для успешного выделения физиологической группы бактерий имеет источник посевного материала. Если среда, откуда выделяются бактерии, уже обогащена искомой группой, то это облегчит выделение. В качестве примера можно привести Mn-окисляющие бактерии – они широко распространены в почве, но проще их будет выделить из образцов глубоководных осадков марганца.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. *Посевом* называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, *пересевом* – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

Получение чистых культур микроорганизмов

Существует множество способов выделения чистой культуры, их используют в зависимости от свойств самих выделяемых бактерий. Но в основе всех методов лежит единый принцип – получение чистой культуры из одной изолированной колонии. Все клетки колонии на твердых питательных средах представляют собой клоны – потомство одной единственной клетки, поэтому подобные колонии очень удобно использовать. Если планируется выделение чистой культуры из жидкой питательной среды, то лучше воспользоваться методом Дригальского (рисунок 10). Для этого нужны стерильный шпатель Дригальского, три (обычно) чашки Петри со средой и непосредственно источник микроорганизмов.

Техника посева следующая:

1. В стерильных условиях приготовить три чашки Петри с твердой средой (расплавить, разлить, остудить).

2. Самплером со стерильным наконечником или стерильной пипеткой внести небольшой объем накопительной культуры или любого другого источника микроорганизмов.

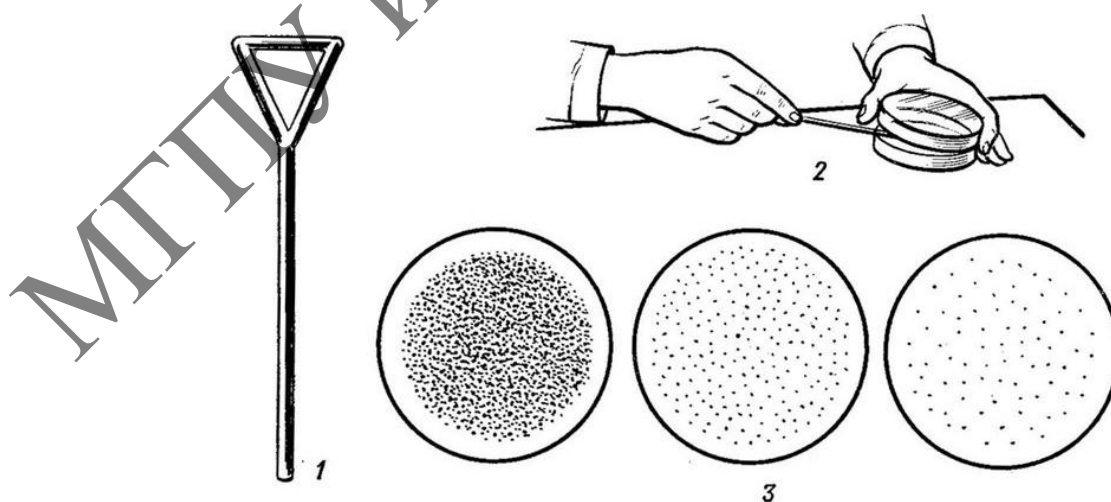
3. Аккуратно, стараясь не повредить агар, стерильным шпателем Дригальского распределить суспензию по всей поверхности среды.

4. Этим же шпателем так же аккуратно и равномерно протереть поверхность твердой среды во второй чашке Петри, затем в третьей.

5. Подписать чашки Петри, перевернуть вверх крышками, чтобы конденсат не мешал росту изолированных колоний, и поместить в термостат на необходимую температуру.

6. Спустя некоторое время (в зависимости от конкретного случая) на твердой среде вырастут изолированные колонии. Чаще всего это происходит на третьей чашке Петри.

7. В стерильных условиях производится пересев данной колонии на скошенный агар для проверки чистоты выделенной культуры.



1 – шпатель Дригальского; 2 – посев; 3 – рост микроорганизмов после посева

**Рисунок 10 – Посев культуры микроорганизмов
на поверхность плотной питательной среды шпателем**

Другой способ выделения чистой культуры – метод истощающего штриха с использованием обычной микробиологической петли.

Техника посева:

1. В стерильных условиях приготовить одну чашку Петри с твердой средой (расплавить, разлить, остудить).
2. В асептических условиях отобрать исследуемую культуру петлей и в несколько параллельных штрихов в одном направлении распределить отобранный материал.
3. Прокалить петлю в пламени докрасна и остудить.
4. Провести серию однонаправленных штрихов стерильной петлей в другом направлении (рисунок 11).
5. Снова прокалить петлю, остудить и провести серию штрихов, также поменяв направление.
6. Повторить цикл.
7. Подписать чашку Петри, перевернуть крышкой вверх и поставить в термостат. Спустя некоторое время в области четвертой группы штрихов появятся изолированные колонии, а в остальных областях, скорее всего, сплошной «газон».

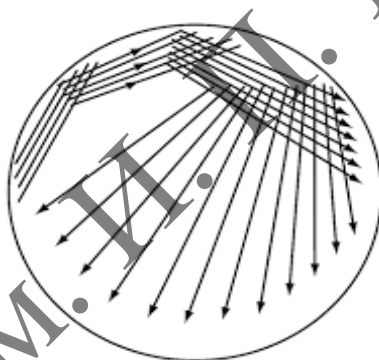


Рисунок 11 – Выделение чистой культуры методом истощающего штриха

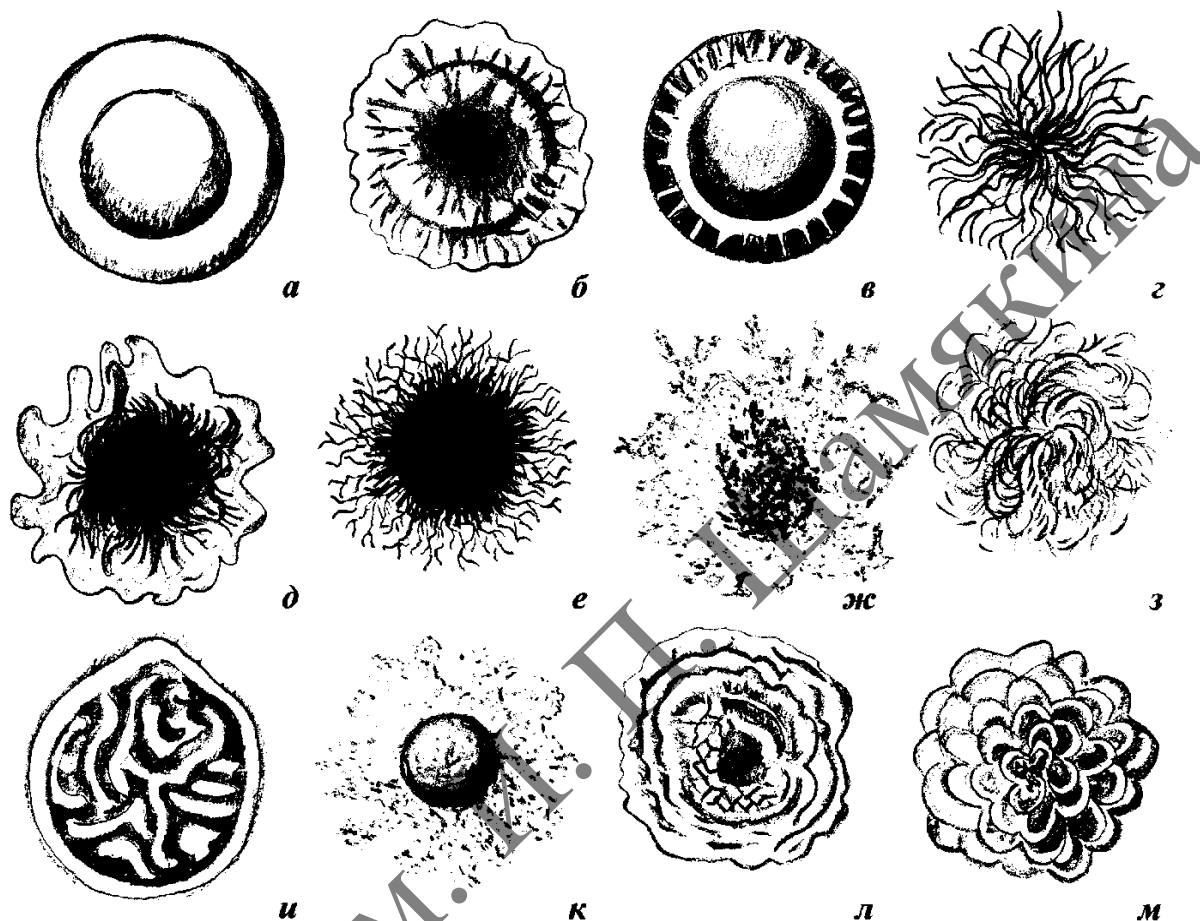
Нередко приходится пересеивать подобными методами колонии микроорганизмов несколько раз с целью выделения чистой культуры. Два вышеописанных способа технологически наиболее просты и подходят лишь для аэробов. Чистые культуры микроаэрофилов и факультативных аэробов получают методом глубинного посева, когда разведения накопительной культуры или другого посевного материала вносятся вглубь столбика агаризованной питательной среды. Сложнее обстоит дело с анаэробными бактериями; для выделения чистых культур анаэробных микроорганизмов существуют особые техники.

Кроме этого, существуют и методы получения чистых культур с помощью специальных приборов – микроманипуляторов и микроселекторов или же с помощью капельного метода.

Рассматривая выросшие колонии в проходящем свете невооруженным глазом (макроскопически) и с помощью лупы описывают следующее:

1. Форму колоний.

Формы колоний, которые могут вырастать на плотной среде в чашках Петри, изображены на рисунке 12.



а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж – амебовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

Рисунок 12 – Форма колоний

Форма колоний может быть круглой, неправильной, корневидной, эллипсовидной и т. д.

2. Размеры колоний.

Колонии, имеющие диаметр более 4 мм, являются крупными, от 2 до 4 мм – средними, от 1 до 2 мм – мелкими, менее 1 мм – точечными или росинчатыми.

3. Цвет колоний.

Микроорганизмы, содержащие пигменты, могут быть желтого, оранжевого, розового, кремового и др. цветов. Большинство микроорганизмов не содержит пигментов и растет на плотных средах в виде серовато-матовых колоний. Такие колонии называют бесцветными.

4. Рельеф (профиль) колоний.

Рельеф (профиль) колоний может быть плоским, выпуклым, куполообразным, смешанным – плоским с выпуклым центром, кратерообразным и др. (рисунок 13).



*а – изогнутый; б – кратерообразный; в – бугристый; г – растающий в агар;
д – плоский; е – выпуклый; ж – каплевидный; з – конусовидный*

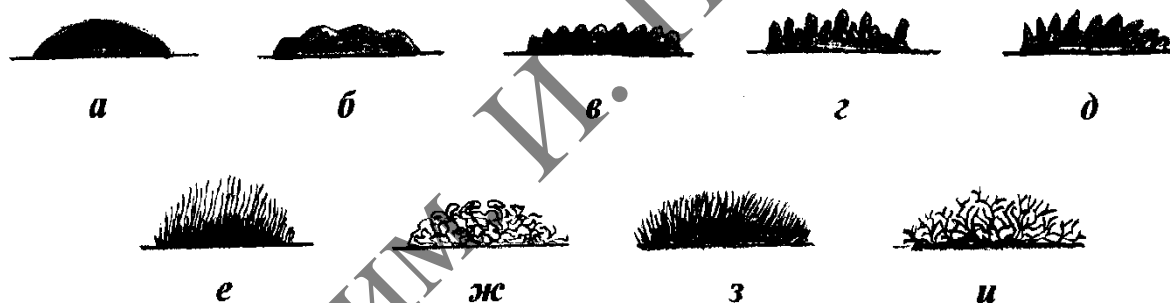
Рисунок 13 – Профиль колоний

5. Поверхность колоний.

Поверхность колоний может быть гладкой, блестящей, шероховатой, морщинистой, извилистой и т. д.

6. Характер края колоний.

Разновидности края колоний изображены на рисунок 14.



*а – гладкий; б – волнистый; в – зубчатый; г – лопастный; д – неправильный;
е – реснитчатый; ж – нитчатый; з – ворсинчатый; и – ветвистый*

Рисунок 14 – Край колоний

Край может быть ровным (гладким); волнистым; локонообразным (нитчатым); лопастным; бахромчатым; зазубренным; корневидным (ветвистым) и др.

7. Прозрачность колоний.

Колонии бывают прозрачные, полупрозрачные и непрозрачные.

8. Структуру колоний.

Структура колоний бывает однородная (гомогенная) и неоднородная (гетерогенная). Неоднородные колонии могут быть мелко- и крупнозернистыми, радиально или концентрически исчерченными, чешуйчатыми и др.

9. Консистенцию колоний.

Определяется при приготовлении препаратов для микроскопического анализа.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ
И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белясова, Н. А. Микробиология : учеб. пособие / Н. А. Белясова – Минск : Выш. шк., 2012. – 174 с.
2. Гусев, М. В. Микробиология : учеб. пособие / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : Академия, 2006. – 461 с.
3. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию : учеб. пособие / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М. : Кн. дом «Университет», 2001. – 255 с.
4. Лысак, В. В. Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2008. – 343 с.
5. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С. А. Павлович. – Минск. : Выш. шк., 2013. – 799 с.
6. Прозоркина, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии : учеб. пособие / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. – Ростов н/Д : Феникс, 2010. – 378 с.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / М. Н. Пименова [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : МГУ, 1995. – 224 с.

СЛОВАРЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ (ГЛОССАРИЙ)

Антисептика – комплекс мероприятий с использованием механических и физических методов воздействия, активных химических веществ и биологических факторов (антисептиков), убивающих или подавляющих размножение микроорганизмов.

Антибиотики – высокоактивные, наследственно закрепленные метаболические продукты микроорганизмов, избирательно подавляющие рост различных бактерий.

Асептика в микробиологии – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов из окружающей среды в материал для исследования, питательные среды и культуры микроорганизмов при лабораторных условиях.

Зона санитарно-защитная – территория вокруг предприятия, на которой запрещается проживание людей и не допускается размещение спортивных сооружений, парков, детских садов, школ, лечебно-профилактических и оздоровительных учреждений.

Дезинфекция – совокупность химических, физических и механических способов полного уничтожения вегетативных и споровых форм определенных групп патогенных для человека организмов с целью разрыва путей передачи возбудителей инфекционных заболеваний от источников инфекции к восприимчивым людям.

Идентификация (индикация) – диагностическое исследование, которое достигается путем определения морфологических, культуральных, биохимических и других признаков микроорганизмов.

Колония – видимое изолированное скопление особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения одной бактериальной клетки на плотной питательной среде.

Культивирование – выращивание микроорганизмов в искусственных условиях.

Культура микроорганизмов – вся совокупность микроорганизмов одного вида, выросших на плотной или жидкой питательной среде L-формы бактерии, полностью или частично утратившие клеточную стенку, но сохранившие способность к размножению.

Микробиоценоз – сообщество популяций микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе.

Микробное число – общее количество микроорганизмов, содержащихся в единице объема или массы исследуемого объекта (1 см³ воды, 1 г почвы, 1 м³ воздуха).

Пастеризация – освобождение от вегетативных форм микроорганизмов путем однократного прогревания при 70–80 °С в течение 10–30 мин с последующим быстрым охлаждением.

Патогенные микроорганизмы – микроорганизмы, которые могут вызывать заболевание.

Питательные среды – среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения бактерий или других микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Резидентная (постоянная) облигатная микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме.

Резистентность – невосприимчивость, устойчивость к действию определенных факторов.

Санитария – это проведение практических мероприятий по осуществлению требований гигиены в целях охраны и укрепления здоровья людей (практическая деятельность, при помощи которой можно сохранить и укрепить здоровье).

Стерилизация – совокупность физических и химических способов полного освобождения объектов внешней среды от вегетативных и покоящихся форм микроорганизмов.

Тиндализация – (дробная стерилизация) стерилизация термолабильных материалов 3–4 кратным прогреванием текучим паром при 100°C по 1 ч с перерывами в сутки, в течение которых материал содержат в термостате при 37 °C (для прорастания спор).

Титр – минимальный объем или масса, в которой обнаруживаются данные бактерии.

Чистая культура – это культура, состоящая из клеток одного вида. По способу получения она представляет собой потомство (клон) одной клетки.

Штамм – культура бактерий одного вида, выделенная из определенного источника (организм человека, животного, окружающая среда) в определенное время и на определенной фазе роста.

Справочное издание

СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО МИКРОБИОЛОГИИ

В двух частях

Часть 1

Составители:

Малашенко Вероника Владимировна,
Мижуй Сергей Михайлович

Корректор *Л. Н. Мазуркевич*
Оригинал-макет *М. В. Бобкова*
Дизайн обложки *Л. В. Клочкова*

Иллюстративный материал на первой странице обложки заимствован из общедоступных Интернет-ресурсов, не содержащих ссылок на авторов этих материалов и ограничения на их заимствование.

Подписано в печать 28.12.2023. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.
Цифровая печать. Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,75.
Тираж 50 экз. Заказ 41.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Мозырский государственный
педагогический университет имени И. П. Шамякина».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий N 1/306 от 22 апреля 2014 г.
Ул. Студенческая, 28, 247777, Мозырь, Гомельская обл.
Тел. (0236) 24-61-29.