

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное агентство по образованию  
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова  
Кафедра ботаники и микробиологии

**Н.Ю. Пухова**

# **Экология микроорганизмов**

**Лабораторные занятия**

***Методические указания***

*Рекомендовано  
Научно-методическим советом университета  
для студентов, обучающихся по направлению Экология  
и природопользование и по специальности Экология*

Ярославль 2008

УДК 579.26  
ББК Е 48я73  
П 88

*Рекомендовано  
Редакционно-издательским советом университета  
в качестве учебного издания. План 2008 года*

Рецензент  
кафедра ботаники и микробиологии  
Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова

**Пухова, Н.Ю. Экология микроорганизмов. Лабораторные занятия: метод. указания / Н.Ю. Пухова; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль : ЯрГУ, 2008. – 55 с.**

В методических указаниях приведены описания лабораторных занятий по экологии микроорганизмов.

Подбор тем работ направлен на выработку у студентов-экологов навыков микробиологической работы, освоения основных методов экологии микроорганизмов, а также умения выделять и изучать бактерии из различных объектов окружающей среды.

Предназначены для студентов, обучающихся по специальности 020801 Экология и направлению 020800 Экология и природопользование (дисциплина «Экология организмов», блок ОПД), очной формы обучения.

УДК 579.26  
ББК Е 48я73

© Ярославский государственный университет, 2008

# 1. Теоретическая часть

## 1.1. Общее представление о прокариотической клетке

### 1.1.1. Размеры и форма клеток прокариот

Большинство бактерий – одноклеточные формы, средние размеры которых варьируют в пределах 0,2 – 10,0 мкм (1мкм =  $10^{-6}$  м). Диаметр самых мелких из известных прокариот (трепонем, микоплазм и нанобактерий) варьирует от 0,05 до 0,10 мкм. Крупными считаются, например, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* с диаметром до 50 мкм. Однако самыми крупными из выделенных до настоящего времени прокариот являются клетки бактерии *Epulopiscium fishelsoni*, обитающей в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга, длиной до 600 мкм и диаметром до 100 мкм.

Формы прокариотических клеток не отличаются большим разнообразием: 1) клетки цилиндрической формы – **палочки** разной длины; 2) сферические клетки – **кокки**; 3) извитые формы – **вибрионы**, **спириллы** и **спирохеты** (рис. 1). Клетки бактерий могут образовывать довольно устойчивые сочетания – пары палочек и кокков (диплококки), короткие и длинные цепочки палочек и кокков (стрептококки), тетрады и пакеты из 4, 8 и более кокковидных клеток (сарцины), гроздь (стафилококки), розетки, плоские таблички, сети и трихомы (цепочки клеток, тесно прилегающие друг к другу, прямые и ветвящиеся).

В то же время существуют микроорганизмы необычной формы (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), ветвящиеся и образующие мицелий (актинобактерии), имеющие гифы с почками (*Hypomicrobium*), стебельки (*Galionella*), простеки (*Caulobacter*, *Ancalomicrobium*) (рис. 2 и 3). Существуют также бактерии, изменяющие свою морфологию в течение жизненного цикла (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) и обладающие плеоморфизмом (рис. 4).

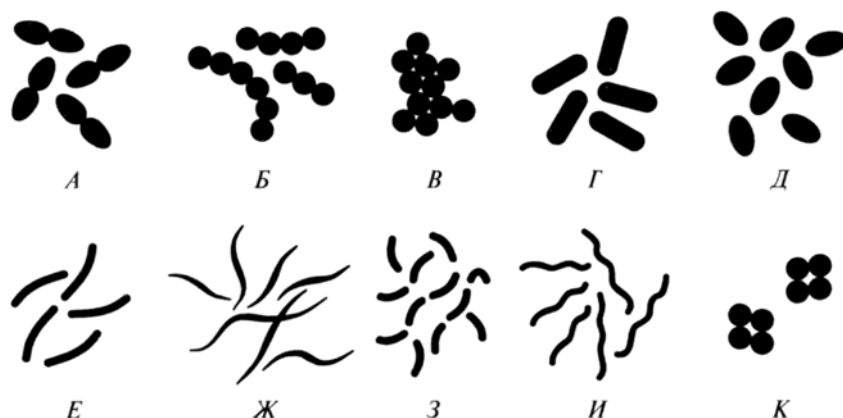


Рис. 1. Формы и сочетания бактериальных клеток  
(Нетрусов, Котова, 2006):

А – диплококки; Б – стрептококки; В – стафилококки; Г – бациллы; Д – коккобациллы; Е – палочки; Ж – тонкие палочки; З – вибрионы; И – спириллы; К – сарцины

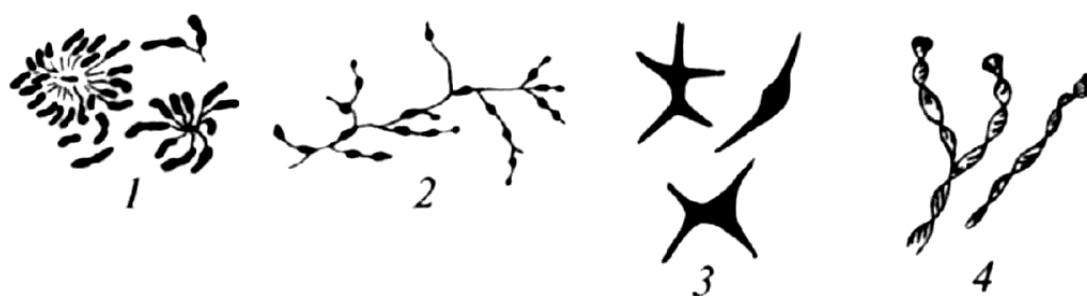


Рис. 2. Бактерии с различными выростами (Нетрусов, Котова, 2006):

1 – *Caulobacter* sp., 2 – *Hyphomicrobium* sp., 3 – *Ancylococcus* sp., 4 – *Galionella* sp.

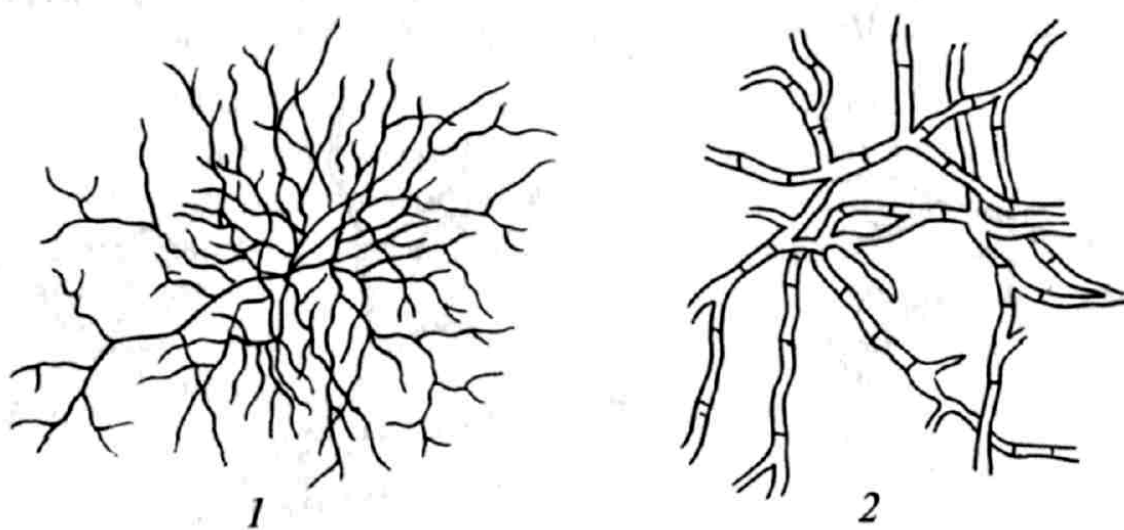


Рис. 3. Мицелиальные организмы при одинаковом увеличении  
(Нетрусов, Котова, 2006): 1 – почвенный актиномицет (прокариоты);  
2 – почвенные грибы (эукариоты)

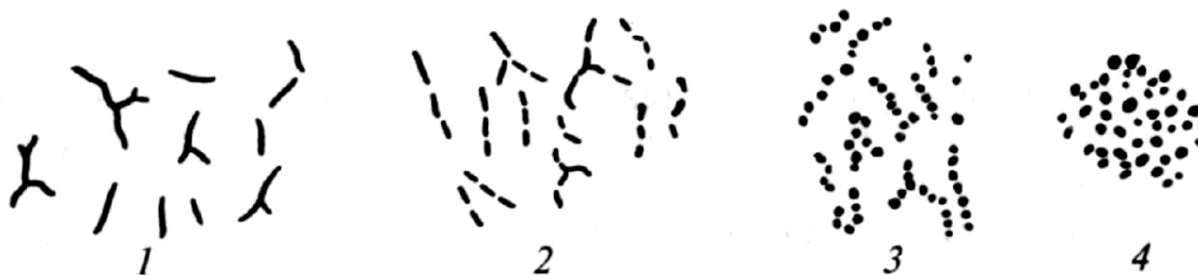


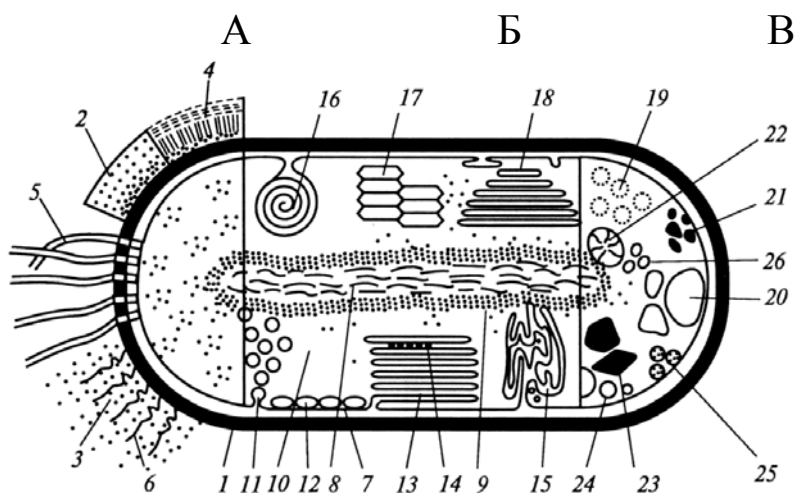
Рис. 4. Формы клеток микобактерий (Нетрусов, Котова, 2006):  
1 – суточная культура, 2 – 2-суточная культура, 3 – 3-4-суточная культура, 4 – 10-суточная культура. На рисунке представлена плейоморфная культура, способная изменять морфологию по мере увеличения срока культивирования, в «старой культуре» распадается на кокковидные тела

### 1.1.2. Строение прокариотической клетки

Схема строения типичной прокариотической клетки приведена на рис. 5. Сравнительная характеристика клеток прокариот и эукариот представлена в Приложении 1.

Внутри бактериальных клеток имеется особая область – **нуклеоид**, где располагается кольцевая и/или линейная суперспирализованная молекула ДНК (бактериальная хромосома). Индивидуальная клетка прокариот может содержать несколько идентичных копий одной хромосомы. У некоторых видов в клетке обнаружены две и даже три неидентичные хромосомы. ДНК прокариот построена так же, как и у эукариот. Содержание пар оснований А+Т и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком.

Значительное количество микроорганизмов дополнительно к хромосоме содержат **плазмиды** – небольшие кольцевые молекулы ДНК, которые могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированными в нее. Плазмиды не являются обязательным для клетки элементом, хотя могут давать определенные преимущества. Известно, что плазмиды могут нести гены устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам; гены факторов патогенности; гены, определяющие дополнительную метаболическую активность и т.п.



*Рис. 5. Комбинированное изображение клетки прокариот  
(Гусев, Минеева, 2003):*

*А – поверхностные клеточные структуры и внеклеточные образования:  
1 – клеточная стенка; 2 – капсула; 3 – слизистый слой; 4 – чехол;  
5 – жгутики; 6 – пили;*

*Б – цитоплазматические клеточные структуры: 7 – ЦПМ; 8 – нуклеоид;  
9 – рибосомы; 10 – цитоплазма; 11 – хроматофоры; 12 – хлоросомы;  
13 – пластинчатые тилакоиды; 14 – фикобилисомы; 15 – трубчатые тилакоиды; 16 – мезосома; 17 – аэросомы (газовые вакуоли);  
18 – ламеллярные структуры;*

*В – запасные вещества: 19 – полисахаридные гранулы; 20 – гранулы поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты; 21 – гранулы полифосфата; 22 – цианофициновые гранулы; 23 – карбоксисомы (полиэдральные тела); 24 – включения серы; 25 – жировые капли; 26 – углеводородные гранулы*

Цитоплазма каждой клетки окружена **цитоплазматической мембраной** (ЦПМ), которая ограничивает клетку от окружающей среды. Снаружи от ЦПМ располагается ригидная **клеточная стенка** (КС), основным опорным элементом которой является муреин (пептидогликан) – поперечно сшитый биополимер, гетерополисахарид, формирующий замкнутый мешок, полностью покрывающий клетку снаружи. Кроме муреина, в состав КС входят теихоевые кислоты, полисахариды, белки, липиды, липополисахариды и липопротеиды. Состав и строение КС – важный систематический признак, по которому все прокариоты подразделяются на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки. Структура клеточных оболочек грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов схематично представлена на рис. 6.

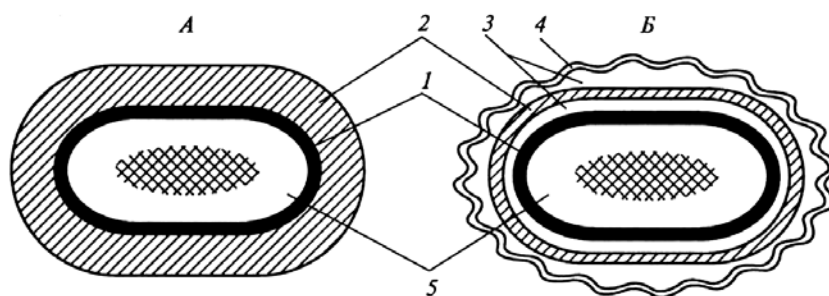


Рис. 6. Клеточная стенка грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий (Гусев, Минеева, 2003):

- 1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – клеточная стенка;  
3 – периплазматическое пространство; 4 – наружная мембрана;  
5 – цитоплазма, в центре которой расположена ДНК

Грамположительные бактерии имеют КС (толщина 20 – 50 нм), содержащую до 40 слоев пептидогликана. Грамотрицательные бактерии обладают более сложно устроенной клеточной оболочкой, имеющей, кроме КС (толщиной около 3 нм), еще **наружную мембрану (НМ)**. Между ЦПМ и НМ возникает **периплазматическое пространство**.

Снаружи КС прокариот часто бывает окружена слизистым веществом. Такие образования в зависимости от структурных особенностей получили название **капсул, слизистых слоев** или **чехлов**. Под капсулой понимают слизистое образование, обволакивающее клетку, сохраняющее связь с КС и имеющее аморфное строение. Если слизистое вещество легко отделяется от поверхности прокариотической клетки, то это слизистый слой. Капсулы и слизистые слои чаще всего полисахаридной, но бывают и гликопротеидной и полипептидной природы. Поэтому поверхность колоний клеток с капсулами выглядит гладкой, влажной и блестящей. В отличие от капсул и слизистых слоев, чехлы имеют тонкую структуру. Нередко в них обнаруживают несколько слоев с различным строением. Чехлы как более сложные структуры имеют обычно и более сложный химический состав.

Хотя капсулы, слизистые слои и чехлы являются необязательными структурами бактериальной клетки, им приписывают определенные полезные функции. Вязкость внеклеточной среды, обусловленная наличием слизистых веществ, очевидно, благоприятна для клетки. Они защищают клетку от механических повреждений, высыхания, создают дополнительный осмотический

барьер, служат препятствием для проникновения бактериофагов. Иногда слизистые образования могут служить источником запасных питательных веществ. С помощью слизи осуществляется связь между соседними клетками в колонии, а также прикрепление клеток к различным поверхностям.

Бактериальные **рибосомы** (70S) служат местом синтеза белка, расположены в цитоплазме. Их количество в клетке зависит от интенсивности белкового синтеза и колеблется от 5000 до 90 000.

**Мезосома** – это инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек или ламелл. Считается, что мезосома участвует в делении клетки, образуя поперечную перегородку; служит местом прикрепления бактериальной хромосомы при репликации, участвует в процессах секреции (у некоторых грамположительных бактерий).

**Жгутики** прокариот служат для передвижения. Их число, размеры, расположение, как правило, являются признаками, постоянными для определенного вида, и поэтому учитываются при систематике прокариот. В зависимости от числа жгутиков и их локализации на поверхности клетки различают *монополярные монотрихи* (один жгутик на одном полюсе клетки), *монополярные политрихи* (пучок жгутиков на одном полюсе клетки), *биполярные политрихи* (на каждом полюсе – по пучку жгутиков) и *перитрихи* (многочисленные жгутики расположены по всей поверхности клетки или вдоль ее боковой поверхности). В последнем случае число жгутиков может достигать около 1000 на клетку. Обычная толщина жгутика – 10–20 нм, длина – от 3 до 15 мкм. С помощью жгутиков бактериальная клетка движется в жидкой среде, скорость движения для разных видов бактерий составляет от 16 до 100 мкм/с.

**Пили** (ворсинки, фимбрии) – нитеобразные полимерные образования белковой природы, локализованные на поверхности клеток. Их насчитывается от нескольких единиц до нескольких тысяч на клетку. Имеются как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий. Эти структуры не имеют отношения к движению бактерий и обнаружены у подвижных и неподвижных форм. Пили тоньше жгутиков (диаметр равен 5–10 нм,



длина – 0,2–2,0 мкм), расположены перитрихально или полярно. Пили выступают как акцепторы бактериофагов, помогают клеткам принимать и передавать ДНК при конъюгации (конъюгативные пили), участвуют в движении клетки, в прикреплении клеток к поверхностям (адгезивные пили) и др.

В цитоплазме прокариот обнаруживаются различные **включения**. Одни из них следует рассматривать как активно функционирующие структуры (*хлоросомы* зеленых бактерий и *фикобилисомы* цианобактерий, в этих структурах локализованы фотосинтетические пигменты), другие – как продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, но откладывающиеся внутри клетки. Некоторые цитоплазматические включения имеют явное приспособительное значение (*магнитосомы* и *аэросомы* (газовые вакуоли) у водных прокариот, помогающие им перемещаться в места, благоприятные для существования). И, наконец, многие из них являются запасными веществами (полисахариды, липиды, полипептиды, поли-β-оксимасляная кислота, полифосфаты, гранулы серы и т.п.), отложение которых клеткой происходит в условиях избытка питательных веществ в окружающей среде, а потребление наблюдается, когда организм попадает в условия голодания.

## **1.2. Культивирование микроорганизмов в лаборатории**

### **1.2.1. Пищевые потребности микроорганизмов**

В состав питательных веществ должны входить все те химические элементы – *макро-* и *микроэлементы*, – которые необходимы для построения клеточного материала, активности ферментов и работы транспортных систем. Кроме того, питательные вещества должны поставлять организму материал, используемый для генерирования биологически доступной энергии.

К **макроэлементам** относятся 12 химических элементов, содержащихся в организме в концентрации выше 0,001% (О, Н, С, N, P, K, Ca, S, Mg, Na, Cl, Fe), преимущественно из них построены органические вещества клеток – нуклеиновые кислоты, белки,

жиры, углеводы, витамины, ферменты и пр. (Приложение 2). Макроэлементы составляют основную массу живого вещества клетки (около 99%), особенно высока концентрация О, Н, С, N (98% всех макроэлементов).

**Микроэлементы** требуются живым организмам в концентрациях от 0,001 до 0,000001% (составляют 1,9% массы клетки). К микроэлементам чаще всего относят Cu, Zn, I, Mn, Co, Mo, Se, Cr, Ni, Si, F, V, W и др. Большинство биологически значимых микроэлементов входят в состав биологически активных веществ (БАВ) – ферментов, витаминов, пигментов и пр.

**Ультрамикроэлементы** (Au, U, Ra и др.) входят в состав клеток в концентрации, которая не превышает 0,000001%. Роль большинства элементов этой группы до сих пор не выяснена.

**Факторы роста** – органические соединения, которые не синтезируются бактериями, но без которых жизнь клетки не возможна (аминокислоты, пурины, пиримидины, витамины и др.). Эти соединения прокариоты должны получать из окружающей среды. Бактерии, нуждающиеся в каком-либо факторе роста, называются *ауксотрофными* по отношению к этому соединению, в отличие от *прототрофных бактерий*, способных синтезировать данное вещество в клетке. Особенно часто микроорганизмы ауксотрофны к аминокислотам. Так, для роста бактериям *Leuconostoc mesenteroides* необходимо не менее 17 аминокислот. Как правило, факторы роста необходимы бактериям в ничтожно малых концентрациях: аминокислоты – 20–50 мкг/мл, пурины и пиримидины – 10–20 мкг/мл, витамины – 0,2–50,0 мкг/мл.

### **1.2.2. Питательные среды для культивирования бактерий**

Потребности прокариот в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма. Во-первых, питательная среда должна включать доступный для клетки *источник энергии*. Для одних микроорганизмов (фототрофов) таким источником служит свет, для других – органический (хемоорганотрофы) или неорганический (хемолитотрофы) субстрат. Во-вторых, среда должна содержать все необходимые компоненты для реализации конструктивных процессов в

клетке, причем синтетические способности бактерий могут варьировать от использования  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода (автотрофы) до потребности в более восстановленных соединениях углерода – кислотах, спиртах, углеводах и др. (гетеротрофы).

По способности использовать те или иные *источники азота* прокариоты также существенно отличаются друг от друга. Одни из них используют молекулярный азот ( $\text{N}_2$ ) из воздуха и не требуют добавления в среду каких-либо азотсодержащих соединений (*азотфиксирующие бактерии*). Другим необходимо присутствие в среде источника азота в виде неорганических солей (например,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) или органических соединений (например, аминокислот). Наиболее требовательные бактерии культивируют на средах, содержащих белки или продукты их неполного расщепления – *пептоны*, представляющие собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, солей и микроэлементов.

Многие бактерии требуют наличия в среде факторов роста. Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить *дрожжевой экстракт*, *дрожжевой автолизат*, а также *кукурузный экстракт*.

Для построения веществ клеток бактериям необходимы фосфор, сера, калий и ряд других макро- и микроэлементов. Они должны содержаться в питательной среде в доступной форме. Потребности разных групп бактерий в макро- и микроэлементах удовлетворяются за счет различных минеральных солей, вносимых в среду в определенном соотношении. Поэтому «минеральный фон» сред для культивирования многих бактерий может быть близким по составу.

По составу среды для культивирования микроорганизмов делят на *натуральные (естественные)* и *синтетические*. К натуральным относятся среды, состоящие из продуктов животного или растительного происхождения: овощные или фруктовые соки, молоко, животные ткани, разведенная кровь, морская и пресная вода, вода минеральных источников, а также отвары или экстракты, полученные из природных субстратов – мяса, рыбы, дрожжей, растений, круп, навоза и почвы. К натуральным относятся также и так называемые *полусинтетические* среды, со-

стоящие из природных продуктов в комбинации с рядом определенных химических соединений. Натуральные среды богаты органическими веществами, но имеют сложный и непостоянный состав, поэтому они малопригодны для исследования обмена веществ микроорганизмов.

Синтетические среды наиболее удобны для изучения метаболизма прокариот. Состав таких сред может варьировать настолько широко, насколько широко изменяются пищевые потребности культивируемых на них микроорганизмов. В зависимости от задачи исследования синтетические среды готовят на водопроводной или дистиллированной воде. Синтетические среды могут иметь довольно большой набор компонентов (включая микроэлементы), но могут быть и относительно простыми по составу.

По назначению среды бывают *элективные* и *дифференциально-диагностические (индикаторные)*. Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. Элективные среды применяют главным образом на первом этапе выделения микроорганизмов из естественных субстратов, т.е. для получения *накопительных культур*. Например, среда Эшби является элективной для азотфиксирующих бактерий. В клинической микробиологии нашли применение дифференциально-диагностические среды, например, среда Эндо предназначена для выявления наличия бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в образцах воды, почвы, продуктах питания и т.п.

По физическому состоянию среды могут быть *жидкими*, *полужидкими*, *твердыми* (плотными) и *сыпучими*. Жидкие среды широко применяют для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Полужидкие среды получают путем добавления к жидким средам 0,5% агар-агара (полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин; агар-агар получают из красных водорослей).

Твердые (плотные) питательные среды содержат 1,5 – 2,0% агар-агара и необходимы для выделения чистых культур микро-

организмов, в диагностических целях, для количественного учета микроорганизмов, хранения культур и др. Кроме агар-агара, в качестве уплотняющих агентов в среды добавляют желатин (белок, получаемый из костей, хрящей и кожи животных) и кремнекислый гель.

Сыпучие (сухие) питательные среды приобретают все большее практическое значение. Стандартность, простота хранения, транспортировки и изготовления делают их весьма удобными для работы. В микробиологическом производстве используются разваренное пшено, отруби.

### **1.2.3. Рецепты некоторых питательных сред, используемых на практических занятиях**

#### *1. Мясопептонный агар (МПА)*

Для широкого спектра хемоорганогетеротрофных бактерий. Содержит мясной экстракт (0,5 – 1,0%), пептон (1,0%), NaCl (0,5%), агар-агар (1,5 – 3,0%). Производится МПА промышленным способом. Среда выпускается в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

#### *2. Кровяной агар*

Специальная бактериологическая среда, служащая для выделения бактерий (например, стрептококков) и установления их гемолитической активности. Для приготовления кровяного агара к расплавленному и охлажденному до 45°C (не выше) МПА добавляют 5 – 10% подогретой стерильной дефибринированной крови барана, кролика, лошади, человека; смешивают и разливают по чашкам Петри, выдерживают сутки в термостате на возможную бактериальную контаминацию (заражение).

#### *3. Среда Эшби*

Элективная синтетическая среда для азотфиксирующих бактерий, содержит (в г/л дистиллированной воды): сахарозу (маннит) – 20,0;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2; NaCl – 0,2;  $K_2SO_4$  – 0,1;  $CaCO_3$  – 5,0; агар-агар – 20,0. В среду рекомендуется вносить смесь микроэлементов – 1 мл/л.

Раствор микроэлементов (по Федорову) содержит в г/л дистиллированной воды:  $H_3BO_3$  – 5,0;  $(NH_4)MoO_4 \times 2H_2O$  – 5,0;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2; KI и NaBr – по 0,5;  $Al_2(SO_4)_3 \times 18H_2O$  – 0,3.

#### 4. Среда Эндо

Элективная среда для энтеробактерий. 100 мл стерильного МПА расплавляют на водяной бане и охлаждают до 70°C, прибавляют 1 г лактозы, предварительно растворенной в стерильной пробирке в небольшом количестве дистиллированной воды и прокипяченной. В отдельных пробирках готовят: 2 – 3 мл спиртового насыщенного раствора фуксина и 10 мл 10%-ного водного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . В стерильную пробирку вносят 1 мл фуксина и прибавляют раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  до обесцвечивания фуксина (бледно-розовый цвет). Приготовленную смесь вливают в расплавленный МПА с лактозой, хорошо перемешивают и разливают по стерильным чашкам. Правильно приготовленная среда в горячем виде имеет бледно-розовый цвет, а при застывании становится бесцветной. Среду используют сразу, без стерилизации.

Среда выпускается промышленным способом в сухом виде. Ее готовят по прописи на этикетке.

#### 1.2.4. Культуральные свойства микроорганизмов

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

##### 1.2.4.1. Рост микроорганизмов на плотных питательных средах

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. *Колонией* называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают *поверхностные*, *глубинные* и *донные* колонии. Образование поверхностных колоний – наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов на плотном субстрате. Такие колонии отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

- *форму* – круглая, амёбовидная, неправильная и т.д. (рис. 7);

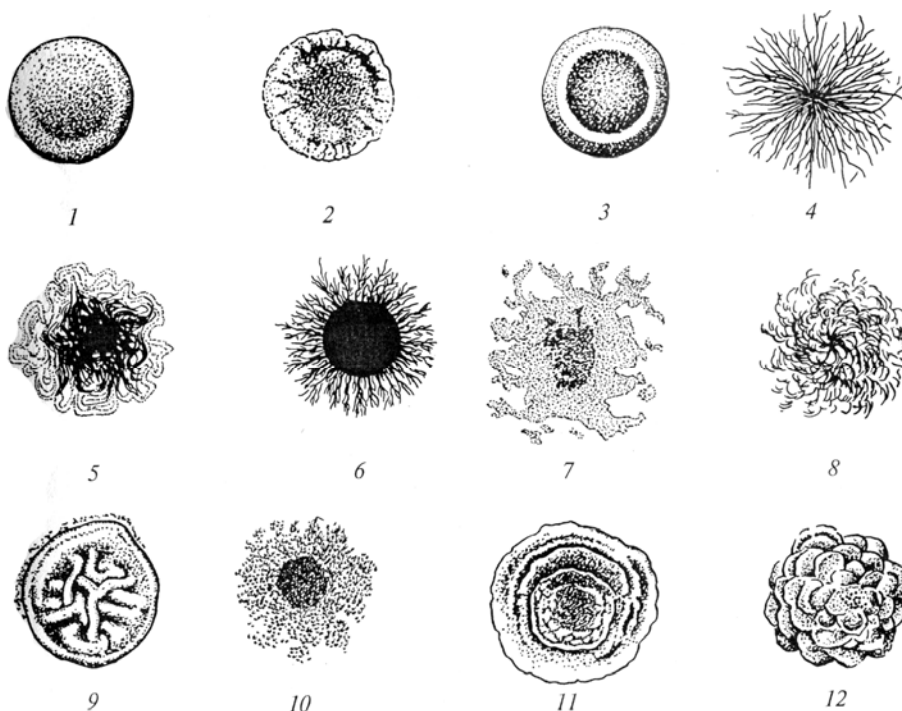


Рис. 7. Форма колонии (Практикум по микробиологии, 2005):

1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

- **размер (диаметр)** – измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;
- **поверхность** – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- **профиль** – плоский, выпуклый, конусовидный и т.д. (рис. 8);

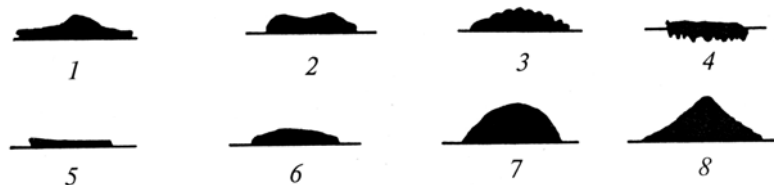


Рис. 8. Профиль колонии (Практикум по микробиологии, 2005):

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

- **блеск и прозрачность** – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная и т.д.;

- *цвет* – бесцветная или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д.; особо отмечают выделение в субстрат пигмента; при описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигмента в среду;

- *край* – гладкий, волнистый, зубчатый, неправильный и т.д. (рис. 9);

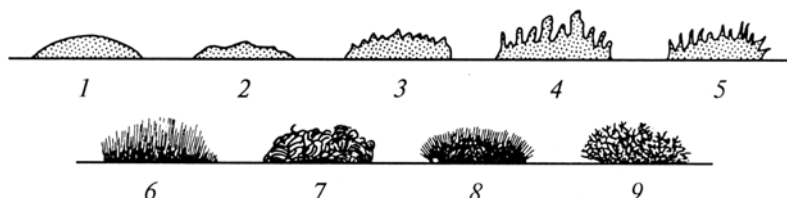


Рис. 9. Край колонии (Практикум по микробиологии, 2005):

1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной;  
5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый;  
9 – ветвистый

- *структуру* – однородная, мелко- или крупнозернистая и т.д. (рис. 10);

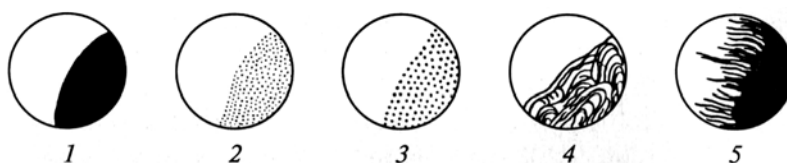


Рис. 10. Структура колонии (Практикум по микробиологии, 2005):

1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая;  
4 – струйчатая; 5 – волокнистая

- *консистенцию* определяют, прикасаясь к поверхности колонии бактериологической петлей. Колония может легко сниматься с твердой питательной среды, быть плотной, мягкой или врастающей в среду, слизистой (прилипает к петле), тягучей, иметь вид пленки (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

*Глубинные колонии* довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции имеющие форму овалов с заостренными концами. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют  $\text{CO}_2$  и другие газы.



*Донные колонии* разных микроорганизмов обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Размеры и многие другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависят от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

При описании роста микроорганизмов *по штриху* отмечают следующие особенности: рост скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, представляющий собой цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный (рис. 11).

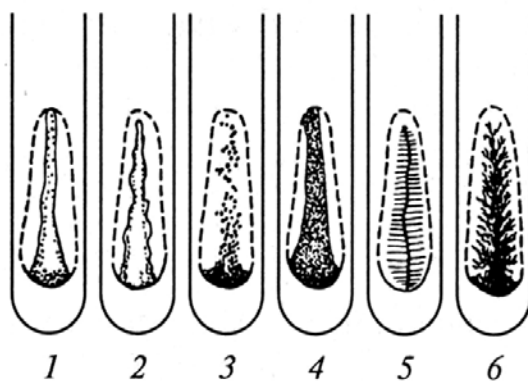


Рис. 11. Рост бактерий по штриху (Практикум по микробиологии, 2005):  
1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

#### 1.2.4.2. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают *степень помутнения* – слабая, умеренная или сильная, *особенности пленки* – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, а при образовании осадка указывают – скудный осадок или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа.

## **2. Практическая часть**

### **2.1. Техника безопасной работы в лаборатории микробиологии**

1. Порядок работы со спиртовками.

1.1. Открыть крышку спиртовки и поправить пинцетом фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.

1.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени ее использования.

1.3. Над горящей спиртовкой не наклоняться, не подносить к ней легковоспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т.п.) и жидкости (спиртовой раствор йода, смесь Никифорова и т.п.); не оставлять, не прекратив ее горение.

2. Работа в лаборатории микробиологии разрешается только в халате, в лаборатории нельзя есть и пить.

3. Работа с бактериальными культурами.

3.1. Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов для микроскопирования берут бактериологической петлей, открывая чашку Петри (или пробирку) в зоне пламени спиртовки (в диаметре 2 – 7 см).

3.2. Оставшиеся на петле после приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. Прокаливание бактериологической петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того, чтобы микробная биомасса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают до красна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной биомассы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

3.3. Если чашка Петри (пробирка) с чистой культурой бактерий разобьется, нужно тщательно собрать разбитые части и поместить их в дезинфицирующий раствор (2 – 3%-ный раствор бикарбоната натрия, 3 – 5%-ный раствор фенола; 0,5 – 3,0%-ный раствор хлорамина и т.п.), руки тщательно вымыть мылом, де-

зинфицирующим раствором. Протереть место попадания культуры дезинфицирующим раствором.

3.4. На столе, где ведут работу с бактериальными культурами, не должно быть лишних предметов, мусора.

3.5. После окончания работы рабочий стол протирают дезинфицирующим раствором, руки тщательно моют мылом.

## **2.2. Лабораторные работы**

### **Лабораторная работа 1. Приготовление и окрашивание бактериальных препаратов**

#### **1. Методические указания**

##### **1.1. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов клеток микроорганизмов**

Получение фиксированных окрашенных препаратов включает несколько этапов: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Для работы используют предметное стекло (78×26 мм). Стекло должно быть чистым и обезжиренным. Для того чтобы обезжирить стекло, нужно:

1) натереть одну из его поверхностей кусочком мыла, потом удалить следы мыла сухой ватой; или 2) обработать предметное стекло спиртом.

**Приготовление мазка.** На обезжиренное предметное стекло помещают маленькую каплю водопроводной (или дистиллированной) воды и вносят в нее бактериологической петлей небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов. Полученную суспензию равномерно распределяют петлей на площади 1 – 2 см максимально тонким слоем.

**Высушивание мазка** лучше всего производить при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание происходит медленно, препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту процедуру следует проводить осторожно, не перегревая мазок, иначе клетки микроорганизмов деформируются.

**Фиксация препарата** преследует несколько целей: убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними; обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу; сделать мазок более восприимчивым к окраске, т.к. мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые. Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат обычно трижды проводят через наиболее горячую часть пламени спиртовки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует нагревать мазок, т.к. при этом происходят грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами.

**Окраска.** Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым относятся красители, у которых красящими свойствами обладает анион, у основных красителей – катион. Примерами кислых красителей служат эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все они интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители – метиленовый синий, основной фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллвиолет, сафранин – интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рРНК в клетке бактерии делает ее более чувствительной к основным красителям.

Различают *простое* и *дифференциальное окрашивание* микроорганизмов. В первом случае прокрашивается вся клетка, так что становится хорошо видна ее морфология и можно определить линейные размеры. Дифференциальное окрашивание выявляет только определенные клеточные структуры.

## **1.2. Простое окрашивание бактериального препарата**

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на стеклянную рейку, расположенную над лотком, наносят на него раствор красителя и выдерживают 1 – 3 мин при окраске фуксином или 3 – 5 мин при использовании синих красителей. Следят за тем,

чтобы во время окрашивания краситель на мазке не подсыхал, и в случае необходимости добавляют новую порцию красителя.

По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет бесцветной. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно промокают фильтровальной бумагой, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают под микроскопом с объективом 100 ×. Для получения более чистых препаратов краситель наносят на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки.

### **1.3. Дифференциальные методы окраски бактериального препарата**

#### **1.3.1. Окраска по Граму**

Окраска по Граму является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда бактерии *делятся на грамположительные и грамотрицательные*. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом, поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксин-ом (или сафранином) они приобретают красную окраску.

#### **Техника окрашивания**

1. Готовят бактериальный препарат, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки.

2. Фиксированный препарат красят через фильтровальную бумагу 2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым.

3. Снимают фильтровальную бумагу и, не промывая мазок водой, обрабатывают его 1 – 2 мин раствором Люголя до почернения.

4. Сливают раствор Люголя и на 0,5 – 1,0 мин наносят на препарат спирт с йодом (2 мл 10%-го спиртового раствора йода).

Обработка спиртом производится до прекращения отхождения лиловых струек.

5. Быстро промывают бактериальный препарат водой. Высушивают между полосками фильтровальной бумаги.

6. Докрашивают мазок фуксином 2 мин через фильтровальную бумагу.

7. Смывают фуксин водой, бактериальный препарат сушат между полосками фильтровальной бумаги и изучают под микроскопом.

*При правильном окрашивании грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грамотрицательные – розово-красный цвет.*

**Примечание:** дифференциальный метод окраски по Граму дает отчетливые результаты при соблюдении (помимо уже упомянутых) ряда существенных условий, а именно:

1) по Граму, рекомендуется окрашивать клетки молодых, чаще всего суточных культур, так как способность удерживать краситель зависит от физиологического состояния бактерий;

2) препараты бактериальных культур следует готовить тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений;

3) высушивание препарата не должно проводиться над пламенем спиртовки;

4) нельзя травмировать бактериальные клетки петлей на предметном стекле в ходе приготовления препарата;

5) фиксация препарата должна быть только над пламенем спиртовки (химические фиксаторы исключаются); подвергать препарат перегреву противопоказано;

6) окрашивать можно лишь полностью остывший мазок.

### **1.3.2. Окраска эндоспор и цитоплазмы по методу Пешкова**

Споры в клетках бактерий можно обнаружить различными способами, в том числе путем дифференциального окрашивания. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования (бациллярный, клостридиальный, плектридиальный; рис. 12), расположение споры в клетке (центральное, эксцентриальное или

полярное), форму свободных спор (круглая, овальная или продолговатая) и определить их размеры. С этой целью просматривают клетки 2 – 3-суточной культуры, так как большинство спорообразующих бактерий проходят за этот период времени все стадии развития – от вегетативной клетки до свободной споры.



Рис. 12. Типы спорообразования у бактерий (Нетрусов, Котова, 2006):  
1 – бациллярный; 2 – клостридиальный; 3 – плектридиальный

### Техника окрасивания

1. Готовят бактериальный препарат, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки.

2. Фиксированный препарат заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло пинцетом над пламенем спиртовки. По мере испарения красителя добавляют новые порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания красителя, составляет приблизительно 10 – 20 с.

3. Предметное стекло охлаждают на воздухе, препарат тщательно промывают водой.

4. Препарат докрасивают в течение 30 с 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного или сафранина.

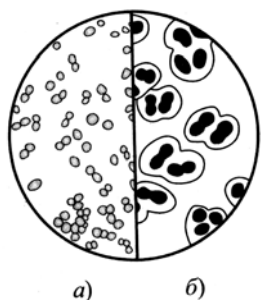
5. Краситель сливают, препарат промывают водой и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

*При правильном окрасивании цитоплазма клеток бактерий окрашивается в красный цвет, а эндоспоры – в синий.*

### 1.3.3. Выявление капсул по методу Гинса

Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте на средах, богатых углеводами, могут быть окружены рыхлым внешним слоем – капсулой или слизью (рис. 13). Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны под микроскопом. Хи-

мический состав капсул у разных видов бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски. Кроме того, капсулы при окрашивании легко деформируются, а вещество капсулы слабо связывает краситель, который легко отмывается в процессе обработки препарата. Чаще всего для выявления капсул применяют способ «негативной» окраски (негативного контрастирования) с помощью жидкой туши.



*Рис. 13. Azotobacter chroococcum (Теплер и др., 2004): а) на гелевых пластинах (среда, содержащая мало органического вещества); б) на среде Эшби (среда, богатая углеводами); культура окрашена по методу Гинса; видны капсулы*

### Техника окрашивания

На край предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю черной туши, вносят в нее клетки, хорошо перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности предметного стекла.

Мазок высушивают на воздухе и фиксируют 5 – 10 мин смесью Никифорова (этиловый спирт и серный эфир в равных объемах).

Препарат окрашивают 2 – 3 мин карболовым фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3.

Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

При правильном окрашивании на темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

## 2. Практическая часть

**Задание 2.1.** Изучение морфологии чистой культуры бактерий из коллекции микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ.

Материалы и оборудование: чистая культура бактерий на МПА в чашке Петри (или в пробирке на скошенном МПА), вода,



бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные стекла, фильтровальная бумага, фуксин, микроскоп.

Ход работы:

1. Приготовление бактериального препарата.
2. Окрашивание фиксированного бактериального препарата фуксином (п. 1.2).
3. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).
4. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая морфологию исследуемой культуры.

**Задание 2.2.** Окрашивание по методу Грама чистой культуры бактерий из коллекции микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ.

Материалы и оборудование: чистая культура бактерий на МПА в чашке Петри (или в пробирке на скошенном МПА), вода, бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные стекла, фильтровальная бумага, карболовый генциановый или кристаллический фиолетовый, раствор Люголя, 10%-ный спиртовой раствор йода, фуксин, микроскоп.

Ход работы:

1. Приготовление бактериального препарата.
2. Окрашивание фиксированного бактериального методом Грама (п. 1.3.1).
3. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).
4. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая грам-принадлежность исследуемой культуры.

**Задание 2.3.** Окраска эндоспор и цитоплазмы по методу Пешкова чистой культуры бактерий рода *Bacillus* из коллекции микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ.

Материалы и оборудование: чистая культура бактерий на МПА в чашке Петри (или в пробирке на скошенном МПА), вода, бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные стекла, фильтровальная бумага, метиленовый синий

по Леффлеру; 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного или сафранина, микроскоп.

Ход работы:

1. Приготовление бактериального препарата.
2. Окрашивание фиксированного бактериального препарата по методу Пешкова (п. 1.3.2).
3. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).
4. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая особенности спорообразования исследуемой культуры.

**Задание 2.4.** Выявление капсул по методу Гинса чистой культуры бактерий рода *Azotobacter* из коллекции микроорганизмов кафедры ботаники и микробиологии ЯрГУ.

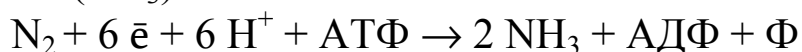
Материалы и оборудование: чистая культура бактерий на МПА в чашке Петри (или в пробирке на скошенном МПА), вода, бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, черная тушь, смесь Никифорова, карболовый фуксин Циля, микроскоп.

Ход работы:

1. Приготовление бактериального препарата.
2. Окрашивание фиксированного бактериального препарата по методу Гинса (п. 1.3.3).
3. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).
4. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая особенности морфологии исследуемой культуры.

## **Лабораторная работа 2. Выделение свободноживущих азотфиксирующих бактерий из почвы**

Использовать запасы молекулярного азота ( $N_2$ ), содержащиеся в большом количестве в атмосфере (78,1% по объему), способны только прокариоты в процессе осуществления *азот-фиксации*, который заключается в связывании и восстановлении  $N_2$  до аммиака ( $NH_3$ ):



Способность прокариот к ассимиляции молекулярного азота обусловлена действием ферментного комплекса (*нитрогеназы*) и происходит с затратой энергии в форме АТФ.

Азотфиксирующих прокариот делят на следующие группы:

1. Живущие в симбиозе с растением – *симбиотические азотфиксаторы*. Бактерии внедряются в ткани корня растения, вызывая образование вздутий – клубеньков. Более чем 1300 видов бобовых растений и более 200 видов небобовых растений имеют клубеньки на корнях. Клубеньковые азотфиксирующие бактерии относятся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и др.

2. Ризосферные (обитающие в прикорневой зоне) и филлосферные (обитающие на поверхности наземных органов растений) бактерии, формирующие ассоциации с различными видами небобовых растений, – *ассоциативные азотфиксаторы*. К настоящему времени известно более 200 видов ассоциативных азотфиксаторов: *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Xanthobacter* и др. Для них характерна колонизация поверхности растений без образования выраженных морфологических структур, но с положительным эффектом на продуктивность растения.

3. *Свободноживущие почвенные азотфиксаторы*. Живут независимо от присутствия растения. Наиболее известны представители родов *Azotobacter* и *Clostridium*.

Все азотфиксирующие бактерии являются *дiazотрофами*, т.е. могут использовать для питания и молекулярный, и минеральный азот.

Азотфиксация – это один из важнейших природных процессов, в результате которого огромные воздушные запасы газообразного неорганического азота превращаются биологическим путем в связанную форму. Далее связанный азот передается по трофическим цепям в экосистеме – от прокариот к эукариотам (от бактерий к растениям, от растений к животным и т.п.). Поскольку запасы молекулярного азота атмосферы могут использоваться только прокариотами, и только они делают его доступным для эукариот, можно говорить о важном экологическом значении этого микробного физиологического процесса в природе – снаб-

жении биосферы одним из важнейших биогенных элементов. Известно, что ежегодно только на поверхности суши бактерии фиксируют до 200 млн т азота и от 30 до 190 млн т – в водных экосистемах.

## **1. Методические указания**

### **1.1. Метод накопительной культуры**

Метод накопительной культуры был введен в практику микробиологических исследований С.Н. Виноградским и М. Бейеринком. Сущность его заключается в создании элективных, т.е. избирательных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемых (необходимых исследователю) микроорганизмов или группы микроорганизмов из смешанной природной популяции.

При создании элективных условий необходимо знать физиологию или отчетливо представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Элективные условия создают чаще всего подбором соответствующих сред, поскольку различные микроорганизмы для своего развития предъявляют неодинаковые требования к источникам питания. Например, азотфиксирующие бактерии могут расти в среде, из состава которой исключены связанные формы азота (например, среда Эшби). Если внести в такую среду образец почвы, то из большого разнообразия имеющихся в ней микроорганизмов в первую очередь будут развиваться азотфиксаторы.

### **1.2. Получение накопительной культуры азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter***

В стерильную чашку Петри заливают расплавленную и охлажденную до 50°C среду Эшби для азотфиксирующих бактерий. После того как среда застынет, производят посев почвы на ее поверхность. Для этого можно использовать стерилизованный в пламени спиртовки пинцет. Чашки Петри с посевами инкубируют в термостате при температуре 28°C. Рекомендуемое время культивирования – 5 – 6 сут.

По окончании времени инкубации комочки почвы обрастают колониями. Слизистые колонии *Azotobacter chroococcum* обычно

приобретают бурую окраску; если бактерии образуют зеленый флуоресцирующий пигмент, то в зависимости от морфологии их предположительно относят либо к *A. agile*, либо к *A. vinelandii* (*A. agile*, как правило, обитает в воде).

## 2. Практическая часть

**Задание 2.1.** Получение накопительной культуры свободно-живущих азотфиксирующих бактерий.

Материалы и оборудование: образцы почвы, стерильные чашки Петри, среда Эшби, пинцет, спиртовка, термостат.

Ход работы:

1. В стерильную чашку Петри заливают расплавленную и охлажденную до 50°C среду Эшби для азотфиксирующих бактерий; процедуру проводят с соблюдением стерильности (при включенной спиртовке, в непосредственной близости от пламени).

2. После того как среда застынет, производят посев почвы на ее поверхность при помощи стерилизованного в пламени спиртовки пинцета; процедуру проводят с соблюдением стерильности.

Чашки Петри с посевами ставят в термостат, выращивание производят при температуре 28°C.

Учет результатов производят на следующем занятии.

**Задание 2.2.** Изучение накопительной культуры азотфиксирующих бактерий.

Материалы и оборудование: чашки Петри с посевами почвы, вода, бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, черная тушь, смесь Никифорова; карболовый фуксин Циля, микроскоп.

Ход работы:

1. Достают из термостата чашки Петри с посевами.

2. Изучают выросшие на среде вокруг комочков почвы колонии бактерий; описывают колонии (форма, размер, поверхность, профиль, блеск и прозрачность, цвет, характер края, профиль, структура, консистенция); делят колонии по культуральным признакам на морфотипы.

3. Выбирают слизистую колонию (известно, что азотобактер образует капсулы на поверхности клетки) и делают бактериальный препарат.

4. Окрашивание фиксированного бактериального препарата по методу Гинса (п. 1.3.3).

5. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).

6. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая особенности морфологии выделенной культуры.

### **Лабораторная работа 3. Микробиота полости рта человека**

Полость рта является исключительно благоприятной средой для существования и размножения самых различных видов микроорганизмов. Это обусловлено постоянным наличием питательных веществ, оптимальной для размножения многих микроорганизмов температурой (около  $37^{\circ}\text{C}$ ), влажностью и рН (около 6,9 – 7,0). Микробиота полости рта подразделяется на постоянную (автохтонную) и случайную (аллохтонную). Обычными представителями нормальной микробиоты ротовой полости являются стрептококки: факультативно анаэробные (в том числе *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, кариесогенные – *S. mutans* и др.) и облигатно анаэробные (р. *Peptostreptococcus*), а также грамположительные нитевидные микроорганизмы (*Actinomyces viscosus*). В составе микробиоты полости рта можно обнаружить также лактобацилл; грамотрицательных кокков, относящихся к родам *Neisseria* и *Velionella*, а также грамотрицательных строгих анаэробов родов *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*. В состав постоянной микробиоты полости рта входят различные виды спирохет (*Treponema denticola*, *T. orale*, *T. macrodenticum*, *Borrelia buccalis*), микоплазмы, нокардии и др. К случайной микробиоте полости рта относятся комменсалы, обитающие на других слизистых оболочках и коже; сапротрофы внешней среды и различные патогенные микроорганизмы, которые попадают в полость рта в результате аэрогенного или алиментарного заражения от больных или бактерионосителей. Очень высокой способностью адаптироваться к существованию в ротовой полости обладают стафило-

кокки, стрептококки, коринебактерии, грибы рода *Candida*, вирусы герпеса, эпидемического паротита и др.

### Практическая часть

**Задание 1.** Микроскопическое исследование микробиоты зубного налета.

Основная масса микроорганизмов в ротовой полости локализуется в зубном налете (зубная бляшка). Бактерии составляют около 70% зубного налета, в 1 мг сухой массы которого содержится 250 млн микробных клеток.

Материалы и оборудование: вода, бактериологическая петля, спиртовка, спички, кювета с рейкой, предметные стекла, фильтровальная бумага, карболовый генциановый или кристаллический фиолетовый, раствор Люголя, 10%-ный спиртовой раствор йода, фуксин, микроскоп.

Ход работы:

1. Приготовление бактериального препарата; стерильной (путем прокалывания в пламени спиртовки) и охлажденной бактериологической петлей соскабливают немного зубного налета у десен, этот материал вносят в каплю воды на предметном стекле, делают суспензию; высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки.

2. Окрасивание фиксированного бактериального препарата методом Грама (п. 1.3.1).

3. Изучение препарата под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).

4. Зарисовка поля зрения под микроскопом, отражая морфологию и грампринадлежность микроорганизмов зубного налета.

**Задание 2.** Изучение микробиоты зева.

Для исследования микробиоты человеческого зева производят посев слизи с миндалин. На миндалинах обнаруживают главным образом стрептококки, включая гемолитические (разрушают гемоглобин), а также стафилококки и коринебактерии. Иногда встречаются энтеробактерии родов *Proteus* и *Klebsiella*, синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), а также фузобактерии, спириллы и вибрионы.

Материалы и оборудование: стерильные ватные тампоны, чашки Петри, среда кровяной агар, спиртовка, термостат.

Ход работы:

1. Стерильным ватным тампоном производят отбор слизи с миндалин.

2. В стерильную чашку Петри, содержащую среду кровяной агар, производят посев слизи с миндалин, осторожно (чтобы не повредить поверхность питательной среды) прикасаясь тампоном к поверхности среды в нескольких местах; процедуру проводят с соблюдением стерильности (при включенной спиртовке, в непосредственной близости от пламени).

3. Чашки Петри с посевами ставят в термостат, выращивание производят при температуре 37°C.

4. Учет результатов производят на следующем занятии.

По истечении срока культивирования (на следующем занятии):

1. Отмечают колонии, вокруг которых есть зоны просветления среды (зоны гемолиза); в зависимости от цвета зоны различают  $\beta$ -гемолиз (зона бесцветная),  $\alpha$ -гемолиз (зона окрашена в зеленый цвет),  $\gamma$ -гемолиз (цвет среды не меняется).

2. Описывают выросшие на среде колонии (форма, размер, поверхность, профиль, блеск и прозрачность, цвет, характер края, профиль, структура, консистенция); делят колонии по культуральным признакам на морфотипы.

3. Делают бактериальный препарат из доминирующих по численности колоний.

4. Окрашивают фиксированный бактериальный препарат фуксином.

5. Изучают препарат под микроскопом с помощью иммерсионной системы ( $\times 100$ ).

6. Зарисовывают поле зрения под микроскопом, отражая морфологию исследуемой культуры.



## Лабораторная работа 4. Определение микробного числа природной и водопроводной воды

Вода природных водоемов содержит большое количество типично водных микроорганизмов (*автохтонная микробиота*), а также попадающих в нее с осадками, сточными водами и другими загрязнениями *аллохтонных микроорганизмов*. Количество и видовой состав микробоценоза воды в значительной степени зависят от условий среды (наличие питательных веществ, температура, аэрация, окислительно-восстановительные условия, pH и др.). Основным путем микробного загрязнения водоемов является попадание неочищенных бытовых и промышленных сточных вод. Микробоценоз сточных вод может содержать обитателей кишечника человека и животных, включая представителей нормальной и условно-патогенной микробиоты. Патогенные бактерии слабо приспособлены к существованию в воде, где на них оказывают неблагоприятное воздействие солнечный свет и различные другие факторы, включая конкурентных водных автохтонных микроорганизмов, тем не менее многие из патогенов могут сохраняться в природных водах достаточно долго.

Микробиологические методы исследования воды сводятся к определению общего количества микроорганизмов в 1 мл воды (*микробное число*) и выявлению патогенных микроорганизмов (сальмонелл, холерных вибрионов, лептоспир, шигелл и энтеровирусов). Последний анализ производится по эпидемическим показаниям. Кроме того, поскольку прямое выделение патогенных бактерий из воды требует специальных исследований, существуют косвенные методы, позволяющие дать количественную оценку степени фекального загрязнения воды (выявление БГКП) – определение *коли-титра* и *коли-индекса* воды.

Коли-титр – минимальное количество воды (мл), в котором обнаруживаются БГКП. Коли-индекс – количество БГКП, содержащихся в 1 л исследуемой воды (по международному и европейскому стандарту – в 100 мл).

Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, сточных жидкостей.

## 1. Методические указания

### 1.1. Отбор проб водопроводной воды

Из водопроводных кранов воду отбирают следующим образом. Кран протирают тампоном, смоченным в спирте, и обжигают, после этого 10 – 15 мин спускают воду. Затем отбирают пробу воды в стерильную колбу, закрывают стерильной резиновой или корковой пробкой.

Бактериологическое исследование отобранных проб воды должно производиться не позднее 2 ч с момента отбора. В случае невозможности соблюдения этих сроков допускается проведение анализа воды не позднее, чем через 6 ч при хранении пробы при температуре от 1 до 6°C.

### 1.2. Рекомендуемые объемы воды для определения микробного числа

№ п/п	Тип исследуемой воды	Объем воды, мл
1.	Водопроводная	1,0
Природная вода:		
2.	<i>Чистая</i>	1,0 и 0,1
3.	<i>Загрязненная</i>	0,01 и 0,001
4.	<i>Сильно загрязненная</i>	0,0001 и 0,00001

Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, отобранных с таким расчетом, чтобы число выросших на чашках Петри колоний варьировало от 30 до 300.

### 1.3. Нормативы для питьевой воды (ГОСТ 2874-82)

№ п/п	Показатель	Норматив
1.	Число микроорганизмов в 1 мл воды (микробное число), не более	100
2.	Число БГКП в 1 л воды (коли-индекс), не более	3

## 2. Практическая часть

Материалы и оборудование: образцы воды для исследования, стерильные пипетки, стерильные чашки Петри, среда РПА, электрическая плитка для разогревания среды, спиртовка, термостат.

Ход работы:

1. Водопроводную воду заливают в объеме 1 мл, воду открытых водоемов – в объемах 1,0; 0,1; 0,01 мл и т.д. (п. 1.2). Все пробы отбирают в пламени спиртовки стерильными пипетками и вносят в стерильные чашки Петри.

2. В чашки Петри с пробой воды заливают 15 – 20 мл расплавленной и охлажденной до 45 – 50°C среды МПА, круговыми движениями тщательно перемешивают среду с пробой воды.

3. Посевы инкубируют в термостате при 37°C до следующего занятия.

На следующем занятии подсчитывают количество выросших на поверхности и в глубине среды колоний и вычисляют микробное число воды – количество микроорганизмов в 1 мл. Микробное число воды выражают в *колониеобразующих единицах* на 1 мл (КОЕ/мл), количество КОЕ соответствует числу колоний, выросших на питательной среде.

## **Лабораторная работа 5. Определение микробного числа воздуха**

Воздух является неблагоприятной средой для развития и размножения микроорганизмов из-за недостатка в нем питательных веществ, капельно-жидкой воды, губительного действия ультрафиолетовых лучей, резких колебаний температуры и т.п. Микробиота воздуха формируется в основном за счет почвенных микроорганизмов, которые вместе с пылью поднимаются в воздух. Обычно из проб воздуха выделяют представителей рода *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *B. mesentericus*, различные виды *Actinomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др. Попадают микроорганизмы в воздух также с растений и животных, с атмосферными осадками, особенно с туманом. Численность бактерий в 1 м<sup>3</sup> воздуха может колебаться от нескольких клеток до десятков и даже сотен тысяч.

Микроорганизмы в воздухе распространены неравномерно. Их больше в центре крупных городов, меньше на окраинах, над лесами, полями, озерами, морями, высоко в горах. Кроме того, микробиота воздуха существенно меняется в зависимости от времени года, климатических условий и многих других факторов.

Наименьшее количество микроорганизмов содержится в воздухе зимой, наибольшее – летом из-за большого количества пыли. К особенностям микробиоты воздуха можно отнести: 1) большое количество спорообразующих форм; 2) наличие пигментированных бактерий (пигменты *каротиноиды* – защита от ультрафиолетового излучения); 3) могут находиться патогенные микроорганизмы (например, возбудители туберкулеза, сибирской язвы, стафилококки, стрептококки и т.п.); 4) микроорганизмы, в том числе патогенные, по воздуху могут переноситься на большие расстояния.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микроорганизмов. Бактериальная обсемененность жилых помещений выше плотности бактерий в атмосферном воздухе. Кроме того, в воздухе жилых помещений больше и патогенных видов, попадающих в воздух от больных людей и животных (капельным путем в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чихании, со слущивающимся эпителием кожных и шерстяных покровов, с пылью загрязненного постельного белья и пр.). В отличие от открытых мест, воздух помещений всегда содержит бактерий больше зимой, чем летом. Особенно много микроорганизмов в помещениях с плохой вентиляцией и освещением.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, гемолитических стрептококков, являющихся показателями контаминации воздуха микробиотой носоглотки человека).

Для снижения количества болезнетворных бактерий в помещениях необходимо проводить влажную уборку, обеспечивать хорошую вентиляцию (проветривание). Для дезинфекции воздуха помещений применяют ультрафиолетовые лампы, распыление химических веществ (например, пропиленгликоля, триэтиленгликоля).

# 1. Методические указания

## 1.1. Седиментационный метод определения микробного числа воздуха

Седиментационный метод (метод Коха) основан на оседании бактериальных частиц и капель под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри. При этом производят перерасчет по Омелянскому: на поверхность  $100 \text{ см}^2$  плотной среды оседает за 5 мин такое количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха.

## 1.2. Критерии оценки микробного обсеменения воздуха

Пробы воздуха	Сезон года	Микробное число	Число гемолитических стрептококков в $1 \text{ м}^3$ воздуха
Атмосферный воздух зеленой зоны	средне-годовые	до 350	-
Жилое невентилируемое помещение			
а) чистый	Лето	до 1500	до 16
б) загрязненный		> 2500	> 36
а) чистый	Зима	до 4500	до 36
б) загрязненный		> 7000	> 124

## 2. Практическая часть

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, стерильная среда МПА, электрическая плитка для разогрева среды, спиртовка, термостат.

Ход работы:

1. В стерильные чашки Петри с соблюдением правил стерильности (в пламени спиртовки) заливают расплавленную и охлажденную до  $45 - 50^\circ\text{C}$  среду МПА, перед дальнейшим использованием среда должна застыть.

2. Стерильные чашки Петри с питательной средой открывают в исследуемом помещении на 5 мин, по истечении времени экспозиции чашки закрывают, заворачивают в бумагу и маркируют.

3. Чашки Петри с посевами ставят в термостат на  $28^\circ\text{C}$  и оставляют до следующего занятия.

На следующем занятии подсчитывают количество выросших на поверхности среды колоний и вычисляют микробное число воздуха – количество микроорганизмов в  $1 \text{ м}^3$ . Микробное число воздуха выражают в *колониеобразующих единицах* на  $1 \text{ м}^3$  (КОЕ/ $\text{м}^3$ ), количество КОЕ соответствует числу колоний, выросших на питательной среде.

Известно, что на площади в  $100 \text{ см}^2$  за 5 мин осаждается примерно столько КОЕ, сколько их находится в 10 л воздуха ( $0,01 \text{ м}^3$ ). Зная площадь чашки Петри, можно подсчитать количество КОЕ в  $1 \text{ м}^3$  воздуха. Для этого число колоний, выросших в чашке Петри, относят к общей площади чашки, затем пересчитывают, сколько таких колоний поместилось бы на  $100 \text{ см}^2$  и далее – в  $1 \text{ м}^3$  воздуха.

*Пример расчета микробного числа воздуха.* В чашке Петри диаметром 10 см выросло 45 колоний микроорганизмов (45 КОЕ). Площадь чашки Петри составит:

$$S = \pi r^2 = 3,14 \times 5^2 = 78,5 \text{ см}^2.$$

Далее подсчитывают число колоний на  $100 \text{ см}^2$  (равнозначных 10 л или  $0,01 \text{ м}^3$  воздуха):

$$78,5 \text{ см}^2 \text{ воздуха содержат } 45 \text{ КОЕ}$$

$$100,0 \text{ см}^2 - x$$

$$x = (100,0 \times 45) : 78,5 = 57 \text{ КОЕ.}$$

Таким образом, в  $0,01 \text{ м}^3$  воздуха находится 57 КОЕ, а в  $1 \text{ м}^3$  их будет в 100 раз больше – 5700 КОЕ.

По окончании подсчета микробного числа воздуха для различных мест отбора пробы составляют сводную таблицу.

Таблица

**Бактериальная обсемененность воздуха в 4 учебном корпусе ЯрГУ**

№ п/п	Обследованное помещение	Микробное число, КОЕ/ $\text{м}^3$
1.		
2.		
3.		

Анализируют данные сводной таблицы и делают заключение о санитарно-бактериологическом состоянии воздуха в обследованном учебном здании, сравнивая полученные величины с критериями санитарной оценки воздуха для жилых помещений.

## Лабораторная работа 6. Количественный учет микроорганизмов почвы

Специфика почвы как среды обитания микроорганизмов состоит в том, что это трехфазная система с очень развитой твердой поверхностью, которая соседствует с жидкой и газовой фазами. Твердые частицы и агрегаты делят почву на многочисленные частично или полностью изолированные микрзоны, в которых создаются резко отличающиеся, а часто противоположные условия. Клетки прокариот имеют микроскопические размеры, и средой их обитания является микросреда. Сотни и тысячи таких микросред сосредоточены в каждой граммe почвы. Итак, почва – это *комплекс одновременно существующих, но совершенно различных микросред*. Они меняются не только в пространстве, но и во времени. В каждой почвенной микрзоне оказываются микроорганизмы, способные использовать любой органический субстрат, причем в различных условиях, которые возникают в микрзоне (рН, окислительно-восстановительные условия, температура, активность воды и пр.). Это достигается благодаря наличию в почве колоссального запаса разнообразных микроорганизмов – *микробного пула*. Почвы обладают по сравнению с другими природными средами самым богатым микробным генофондом. В каждый момент времени *большая часть микроорганизмов находится в неактивном состоянии*. Основными зонами микробной активности являются растительные, животные и микробные остатки, ризосфера и кишечный тракт почвенных животных.

### 1. Методические указания

#### 1.1. Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского – Брида)

Этот метод применяется в различных модификациях для определения численности микроорганизмов в разнообразных естественных субстратах – почве, загрязненной воде, оптически непрозрачных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например крахмал, соевую муку и т.д. Преимущество метода заключается также в том, что фиксированные окрашенные препараты могут долго храниться, поэтому подсчет можно производить в удобное для исследователя время.

Приготовление препарата. Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой размечен прямоугольник площадью 4 или 6 см<sup>2</sup>. Затем на стекло наносят точно отмеренный объем исследуемой суспензии (10; 20 или 30 мкл). Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают эритрозином, метиленовым синим, фуксином или другим красителем. Затем препарат промывают, последовательно погружая стекло в 4 – 5 сосудов с водой (промывать в проточной воде не следует) и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

Правила подсчета. Препарат микроскопируют с иммерсионным объективом. Подсчитывают количество клеток в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать в 50 – 100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее 600. Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = (aS : sV) \times n,$$

где  $M$  – количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата;  $a$  – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);  $s$  – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм<sup>2</sup>;  $V$  – объем нанесенной на стекло суспензии, мл;  $S$  – площадь мазка, мм<sup>2</sup>;  $n$  – коэффициент разведения исследуемого субстрата.

Площадь квадрата сетки, или поля зрения, определяют с помощью объект-микрометра, который помещают на столик микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения. Площадь поля зрения вычисляют по формуле  $S = \pi r^2$ .

## **1.2. Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (метод Коха)**

Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и

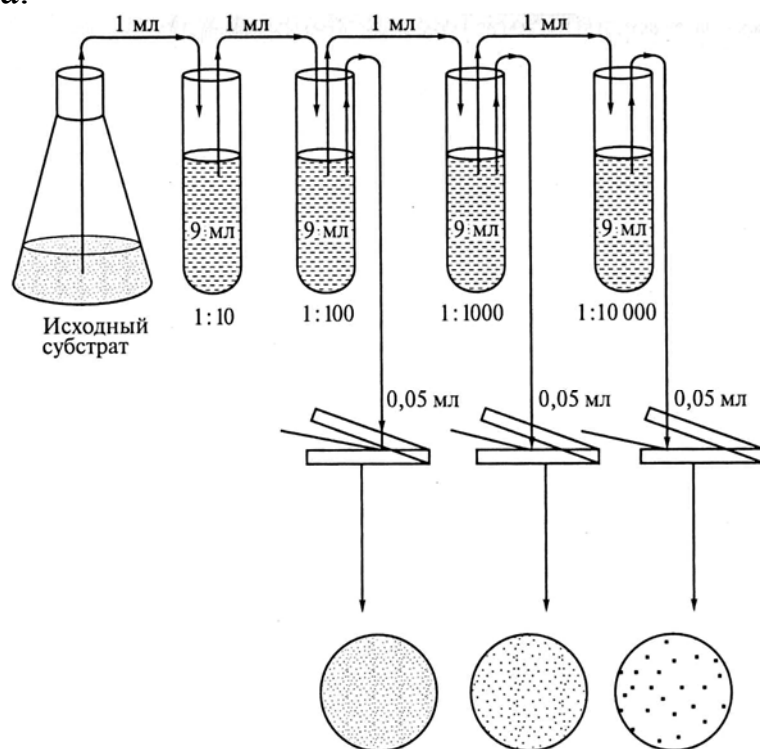


в лабораторных культурах. Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Приготовление разведений. 40 – 45 г исследуемой почвы помещают на стерильное часовое стекло, стерильным пинцетом удаляют из образца камни и растительные остатки. После этого взвешивают 10 г почвы и переносят в стерильную фарфоровую ступку, добавляют 2 – 3 мл стерильной воды и растирают 5 мин пальцем в стерильной резиновой перчатке для диспергирования почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц. Затем почву переносят в стерильную колбу, многократно смывая остатки почвы со стенок ступки. Необходимо следить за тем, чтобы общий объем использованной воды составлял 90 мл (вместе с водой, добавленной при растирании; соотношение почва: вода равно 10 : 90, что соответствует разведению  $10^{-1}$ ). Почвенную взвесь в колбе взбалтывают в течение 10 мин, после этого отстаивают в течение 30 мин.

Численность популяции микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Для этого готовят ряд пробирок с 9 мл стерильной водопроводной воды или с 0,85%-ным водным раствором NaCl (физиологический раствор). Затем 1 мл исследуемой суспензии (разведение  $10^{-1}$ ) стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды (физиологического раствора) – это второе разведение ( $10^{-2}$ ). Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, несколько раз заполняя пипетку и выпуская из нее полученную суспензию. Затем той же пипеткой отбирают 1 мл образца, переносят во вторую пробирку, получая третье разведение ( $10^{-3}$ ). Таким же образом готовят следующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно: она тем больше, чем больше плотность популяции. Схема приготовления разведений и последующего посева на плотную питательную среду представлена на рис. 14.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата вследствие высокой способности клеток микроорганизмов к сорбции на поверхности стекла.



*Рис. 14. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов*

**Посев.** Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом (рис. 14) разливают расплавленную агаризованную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15 – 20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока она не застынет. Затем в чашку Петри вносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают 2 – 4 параллельных высева. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель.

При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило, 0,1; 0,5 или 1,0 мл) исходной суспензии или разведения вно-

сят стерильной пипеткой в 2 – 4 пустые стерильные чашки Петри. Затем заливают в чашки по 15 – 20 мл среды, расплавленной и охлажденной до 45 – 50°C, смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после этого чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. После посева чашки Петри помещают в термостат при 28°C крышками вниз.

Подсчет выросших колоний. Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 1 – 15 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, подсчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты.

Лучшим разведением следует считать то, из которого при высеве в чашке Петри вырастает от 30 – 50 до 100 – 150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл почвенной суспензии вычисляют по формуле:

$$M = a \times 10^n : V,$$

где M – количество клеток в 1 мл; а – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения; V – объем суспензии, взятый для посева, мл;  $10^n$  – коэффициент разведения.

## **2. Практическая часть**

**Задание 2.1.** Количественный учет микроорганизмов почвы методом Виноградского – Брида.

Материалы и оборудование: образцы почвы, весы, пинцет, стерильные фарфоровые ступки, стерильные резиновые перчатки, колбы со стерильным физиологическим раствором, пробирки с 9 мл стерильного физиологического раствора для разведений, предметные стекла, миллиметровая бумага, пипетки, спиртовка, красители, окулярная сетка, объект-микрометр.

Ход работы:

1. Приготовление разведений почвенной суспензии (см. п. 1.2).

2. Приготовление препаратов для микроскопирования из разных разведений (см. п. 1.1.).

3. Подсчет клеток бактерий под микроскопом.

4. Подсчет клеток в почвенном образце и пересчет полученного результата на 1 г почвы.

**Задание 2.2.** Количественный учет микроорганизмов почвы методом Коха.

Материалы и оборудование: образцы почвы, весы, пинцет, стерильные фарфоровые ступки, стерильные резиновые перчатки, колбы со стерильным физиологическим раствором, пробирки с 9 мл стерильного физиологического раствора для разведений, стерильные чашки Петри, стерильная среда МПА, стерильные пипетки, электрическая плитка для разогрева среды, спиртовка, термостат.

Ход работы:

1. Приготовление разведений почвенной суспензии (см. п. 1.2.).

2. Глубинный посев в чашки Петри (см. п. 1.2.).

3. На следующем занятии проводят подсчет выросших колоний и подводят итоги по количественному учету микроорганизмов почвы. *Результат по численности почвенных микроорганизмов должен быть пересчитан на 1 г почвы.*

**Задание 2.3.** Сравнение методов количественного учета микроорганизмов почвы.

Используя полученные результаты по количественному учету микроорганизмов почвы двумя методами – методом Виноградского – Брида и методом Коха, – предлагается сравнить полученные данные. Для этого необходимо заполнить таблицу.

Таблица

***Сравнение методов количественного учета  
почвенных микроорганизмов***

№ п/п	Разведение	Численность микроорганизмов, кл/г почвы	
		Метод Виноградского – Брида	Метод Коха
1.			
2.			

При получении несоответствия по учету численности почвенных микроорганизмов для каждого почвенного образца, объяснить причины несовпадения результатов.

## **Примерные темы рефератов по курсу «Экология микроорганизмов»**

1. Стратегии жизни микробных популяций
2. Почва как среда обитания для микроорганизмов
3. Микробоценозы пресных и морских вод
4. Микробоценозы воздуха
5. Микроорганизмы льда и снега
6. Олиготрофные бактерии
7. Влияние температуры на прокариоты
8. Влияние pH на прокариоты
9. Влияние гидростатического давления на прокариоты
10. Влияние ультразвука на прокариоты
11. Радио- и УФ-резистентность у прокариот
12. Влияние электромагнитного излучения на микроорганизмы
13. Влияние тяжелых металлов на микроорганизмы
14. Антибиотикорезистентность у прокариот
15. Анабиоз у прокариот
16. Дифференциация и покоящиеся формы у микроорганизмов
17. Цианобактериальные сообщества в природе
18. Микроорганизмы – паразиты водорослей и высших растений
19. Микробиота филлосферы
20. Микробиота ризосферы
21. Бактерии – симбионты простейших
22. Микроорганизмы и газовый состав атмосферы
23. Микробные сообщества глубоководных гидротерм
24. Формирование почвенных минералов и участие в них микробных процессов
25. Микробные сообщества очистных сооружений
26. Бактериальная деградация нефти

# Список рекомендуемой литературы

## ***I. Основная***

1. Гусев, М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2003. – 464 с.
2. Нетрусов, А.И. Микробиология / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Академия, 2006. – 352 с.
3. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова и др. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
4. Пухова, Н.Ю. Экологическая физиология микроорганизмов. Часть 2. Аутэкология микроорганизмов / Н.Ю. Пухова – Ярославль: ЯрГУ, 2006. – 128 с.
5. Экология микроорганизмов / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.

## ***II. Дополнительная***

6. Беккер, М.Е. Анабиоз микроорганизмов / М.Е. Беккер, Б.Э. Дамбегр, А.И. Раппопорт. – Рига: Зинатне, 1981. – 253 с.
7. Глазовская, М.А. Геохимические функции микроорганизмов / М.А. Глазовская, Н.Г. Добровольская. – М.: МГУ, 1984. – 152 с.
8. Горленко, В.М. Экология водных микроорганизмов / В.М. Горленко, Г.А. Дубинина, С.И. Кузнецов. – М.: Наука, 1977. – 289 с.
9. Громов, Б.В. Экология бактерий / Б.В. Громов, Г.В. Павленко. – Л.: ЛГУ, 1989. – 248 с.
10. Добровольская, Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв / Т.Г. Добровольская. – М.: Академкнига, 2002. – 282 с.
11. Емцев, В.Т. Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.
12. Жизнь микробов в экстремальных условиях / под ред. Д. Кашнера. – М.: Мир, 1981. – 519 с.

13. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Университет, 2001. – 256 с.
14. Звягинцев, Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: МГУ, 2005. – 445 с.
15. Современная микробиология. Прокариоты: в 2 т. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005.
16. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
17. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

# Приложения

## Приложение 1

### Некоторые отличительные признаки эукариот и прокариот

№ п/п	Характеристика	Прокариоты	Эукариоты
1	2	3	4
<b>Особенности строения клетки</b>			
1.	Наличие ядра	Обособленного ядра нет	Морфологически обособленное ядро, отделенное от цитоплазмы двойной ядерной мембраной
2.	Число хромосом и их строение	В клетке одна кольцевая и/или линейная хромосома. Хромосом может быть несколько. Двухцепочечная ДНК не связана с белками гистонами	Определенное для каждого вида. Хромосомы линейные, двухцепочечная ДНК связана с белками гистонами
3.	Плазмиды	Имеются	Имеются у митохондрий и пластид
4.	Наличие ядрышек	Отсутствуют	Имеются
5.	Организация генома	Имеется до 1,5 тыс. генов. Большинство генов представлено в единственной копии (за исключением нескольких генов, кодирующих синтез РНК)	В зависимости от вида – от 5 до 200 тыс. генов (у человека – около 100 тыс.). Доля генов, представленных в нескольких копиях, может достигать 45%. Это повышает надежность работы генома
6.	Движение цитоплазмы	Отсутствует	Наблюдается часто
7.	Рибосомы	Мельче, чем у эукариот, – 70S*. Распределены в цитоплазме. Обычно свободные, но могут быть связа-	Крупные, 80 S. Находятся в цитоплазме в свободном состоянии или связаны с мембра-



		ны с мембранными структурами. Составляют до 40% от массы клетки	нами ЭПС. В пластидах и митохондриях содержатся рибосомы бактериального типа – 70S
8.	Одномембранные органоиды	Отсутствуют. Их функции выполняют выросты клеточной мембраны	Многочисленны: эндоплазматическая сеть (ЭПС), аппарат Гольджи, вакуоли, лизосомы и т.д.
9.	Двухмембранные органоиды	Отсутствуют	Митохондрии – у всех эукариот; пластиды – у растений
10.	Клеточный центр	Отсутствует	Имеется в клетках животных, грибов; у растений – только в клетках водорослей и мхов
11.	Мезосома	Имеется. Участвует в делении клетки и в метаболизме	Отсутствует
12.	Клеточная стенка	У бактерий содержит муреин, у цианобактерий – целлюлозу, пектиновые вещества, немного муреина	У растений – целлюлозная, у грибов – хитиновая, у животных клеток клеточной стенки нет
13.	Капсула, слизистый слой, чехол	Имеется у некоторых бактерий	Отсутствует
14.	Жгутики	Не содержат микротрубочек. Диаметр 20 нм	Содержат микротрубочки (9 дублетов из микротрубочек и 2 центральные микротрубочки). Диаметр 200 нм
15.	Размер клеток	Диаметр 0,5 – 5,0 мкм	Диаметр обычно до 50 мкм
16.	Митоз	Отсутствует	Имеется
17.	Мейоз	Отсутствует	Имеется
18.	Амитоз	Отсутствует	Имеется
19.	Бинарное деление	Имеется	Отсутствует
20.	Почкование	Имеется (почкующиеся бактерии)	Имеется (например, у дрожжей)
21.	Гаметогенез	Отсутствует	Имеется
22.	Оплодотворение и образование зиготы	Отсутствует	Имеется

23.	Спорообразование	Часть представителей способна образовывать споры из клетки. Они предназначены только для перенесения неблагоприятных условий среды, споры имеют толстую стенку	Спорообразование свойственно растениям и грибам. Споры предназначены для размножения
<b>Питание</b>			
24.	Диффузия, или транспорт, через мембрану	Имеется	Имеется
25.	Эндоцитоз	Отсутствует. Невозможен из-за наличия жесткой клеточной стенки	Характерен для клеток животных, у грибов и растений отсутствует
<b>Метаболические особенности</b>			
26.	Дыхательный и фотосинтезирующий аппарат ассоциирован с плазматической мембраной или ее выростами	Да	Нет
27.	Возможность хемолитотрофного метаболизма	Имеется	Отсутствует
28.	Способность к азотфиксации	Имеется	Отсутствует
29.	Способность к метаногенезу	Имеется	Отсутствует
30.	Способность к аноксигенному фотосинтезу	Имеется	Отсутствует

**Примечание.** (\*) – обозначения 70S, 80S и др. – константы седиментации, характеризующие скорость, с которой эти частицы осаждаются в центрифуге при определенных стандартных условиях.

## Приложение 2

### Функции макроэлементов и основных микроэлементов в метаболизме прокариот

Макроэлементы			
№	Элемент	Источник	Функция в метаболизме
1	2	3	4
1.	Углерод (C)	Органические соединения, CO <sub>2</sub>	Основные компоненты клетки
2.	Кислород (O)	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, органические соединения, CO <sub>2</sub>	
3.	Водород (H)	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, органические соединения	
4.	Азот (N)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub> , органические соединения	
5.	Сера (S)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sup>0</sup> , HS <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> , органические соединения	Компонент аминокислот ЦИС, МЕТ, тиаминпирофосфата, коэнзима А (КоА), биотина и α-липоевой кислоты
6.	Фосфор (P)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов и нуклеотидов (АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ, НАД <sup>+</sup> , ФАД <sup>+</sup> , НАДФ <sup>+</sup> ), тейхоевых кислот
7.	Калий (K)	K <sup>+</sup>	Основной неорганический катион в клетке, кофермент некоторых ферментов
8.	Магний (Mg)	Mg <sup>2+</sup>	Кофермент многих ферментов (например, киназ), присутствует в КС, мембранах и эфирах фосфорной кислоты, определяет агрегацию мономеров рибосомы

9.	Кальций (Ca)	Ca <sup>2+</sup>	Кофермент ферментов, присутствует в экзоферментах (амилаза, протеаза); дипиколинат кальция является важным компонентом эндоспор
10.	Железо (Fe)	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Содержится в цитохромах, ферредоксинах и других железосеропротеидах, кофермент ферментов (например, дегидрогеназ)
11.	Натрий (Na)	Na <sup>+</sup>	Необходимы галофильным бактериям для осуществления механизмов осморегуляции
12.	Хлор (Cl)	Cl <sup>-</sup>	
Микроэлементы			
13.	Цинк (Zn)	Zn <sup>+</sup>	Содержится в следующих ферментах: алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК-полимеразе, в некоторых протеазах
14.	Марганец (Mn)	Mn <sup>2+</sup>	Содержится в бактериальной супероксиддисмутазе (СОД); кофермент некоторых ферментов (например, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, цитратсинтазы)
15.	Молибден (Mo)	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Содержится в следующих ферментах: нитратредуктазе, нитрогеназе, формиатдегидрогеназе, ксантиндегидрогеназе
16.	Селен (Se)	SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Содержится в ферментах глицинредуктазе и формиатдегидрогеназе, встречается в тРНК
17.	Медь (Cu)	Cu <sup>2+</sup>	Содержится в ферментах, взаимодействующих с O <sub>2</sub> : цитохром c-оксидазе, некоторых СОД, пластоцианине, оксигеназах
18.	Кобальт (Co)	Co <sup>2+</sup>	Содержится в коферменте витамин-B <sub>12</sub> -ферментов (глутаматмутаза, метилмалонил-КоА-мутаза)
19.	Вольфрам (W)	WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Содержится в некоторых формиатдегидрогеназах
20.	Никель (Ni)	Ni <sup>2+</sup>	Содержится в ферментах: уреазе, гидрогеназе, СО-дегидрогеназе

## Оглавление

<b>1. Теоретическая часть .....</b>	<b>3</b>
<i>1.1. Общее представление о прокариотической клетке.....</i>	<i>3</i>
1.1.1. Размеры и форма клеток прокариот .....	3
1.1.2. Строение прокариотической клетки.....	5
<i>1.2. Культивирование микроорганизмов в лаборатории.....</i>	<i>9</i>
1.2.1. Пищевые потребности микроорганизмов .....	9
1.2.2. Питательные среды для культивирования бактерий.....	10
1.2.3. Рецепты некоторых питательных сред, используемых на практических занятиях.....	13
1.2.4. Культуральные свойства микроорганизмов .....	14
<b>2. Практическая часть.....</b>	<b>18</b>
<i>2.1. Техника безопасной работы в лаборатории         микробиологии.....</i>	<i>18</i>
<i>2.2. Лабораторные работы.....</i>	<i>19</i>
Лабораторная работа 1. Приготовление и окрашивание бактериальных препаратов .....	19
Лабораторная работа 2. Выделение свободноживущих азотфиксирующих бактерий из почвы .....	26
Лабораторная работа 3. Микробиота полости рта человека ....	30
Лабораторная работа 4. Определение микробного числа природной и водопроводной воды .....	33
Лабораторная работа 5. Определение микробного числа воздуха.....	35
Лабораторная работа 6. Количественный учет микроорганизмов почвы .....	39

<b>Список рекомендуемой литературы.....</b>	<b>466</b>
<i>I. Основная.....</i>	<i>466</i>
<i>II. Дополнительная .....</i>	<i>466</i>
<b>Примерные темы рефератов по курсу «Экология     микроорганизмов» .....</b>	<b>458</b>
<b>Приложения.....</b>	<b>46</b>
<i>Приложение 1. Некоторые отличительные признаки эукариот         и прокариот.....</i>	<i>48</i>
<i>Приложение 2. Функции макроэлементов и основных         микроэлементов в метаболизме прокариот.....</i>	<i>51</i>

Учебное издание

**Пухова** Наталия Юрьевна

# **Экология микроорганизмов**

**Лабораторные занятия**

*Методические указания*

Редактор, корректор И.В. Бунакова  
Компьютерная верстка Е.Л. Шелеховой

Подписано в печать 21.07.2008 г. Формат 60х84/16.  
Бумага тип. Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 2,36.  
Тираж 100 экз. Заказ .

Оригинал-макет подготовлен  
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.  
Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет.  
150000 Ярославль, ул. Советская, 14.





Н.Ю. Пухова

# Экология микроорганизмов

## Лабораторные занятия

