

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ

- Тема 1* – Микроскопические методы исследования микроорганизмов.
Тема 2 – Приготовление питательных сред и методы стерилизации.
Тема 3 – Получение накопительных и чистых культур микроорганизмов.
Тема 4 – Идентификация микроорганизмов.
Тема 5 – Методы количественного учета микроорганизмов.

ЗАНЯТИЕ 1

Введение. Правила работы в микробиологической лаборатории

Тема: Микроскопические методы исследования микроорганизмов

Цель занятий 1-3: знакомство с морфологией и цитологией разных микроорганизмов. Для этого студентам необходимо изучить устройство микроскопа, ознакомиться с особенностями разных видов микроскопии и научиться готовить препараты микроорганизмов.

Приготовление препаратов живых микроорганизмов и знакомство с их морфологией.

Препараты готовят на обезжиренных предметных стеклах. Живые микроорганизмы рассматривают в препаратах "раздавленная капля", "висячая капля" и "отпечаток". Для приготовления препарата "раздавленная капля" на предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее с помощью простерилизованной в пламени горелки бактериологической петли небольшое количество культуры изучаемого микроорганизма, выросшей на твердой питательной среде, размешивают и накрывают покровным стеклом. Каплю культуры, выращенной в жидкой питательной среде, наносят на предметное стекло стерильной пипеткой. Капля исследуемого материала должна быть настолько мала, чтобы после прижимания ее покровным стеклом не было избытка жидкости, выступающего из-под него. В противном случае избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой, которую затем опускают в дезинфицирующий раствор. Препараты живых клеток рассматривают с "сухими системами" микроскопа (8х и 40х). Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Задание. Приготовить препараты "раздавленная капля" микроорганизмов с различной морфологией: кокки - *Micrococcus luteus*; стрептококки - *Leuconostoc mesenteroides*; палочковидные бактерии - *Lactobacillus delbrueckii*, извитые формы - *Rhodospirillum rubrum*; нитчатые формы - *Oscillatoria sp.*, *Spirulina sp.*, *Anabaena variabilis*, *Fischerella muscicola*. Просмотреть и зарисовать микроорганизмы, отметить форму и сочетание клеток.

Примечание. Вместо указанных видов могут быть использованы другие организмы с соответствующей морфологией. Часть микроорганизмов может быть продемонстрирована в виде готовых препаратов.

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с.24-30; 56-61; 69-73; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с. 5-20, 22-28, 81-102 (1995), с. 5-16, 26-41, 54-57(1983).

ЗАНЯТИЕ 2

Тема: Микроскопические методы исследования микроорганизмов

Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов и знакомство с их морфологией.

На обезжиренное предметное стекло помещают каплю водопроводной воды и вносят в нее бактериологической петлей культуру с твердой среды. Каплю жидкой культуры наносят на предметное стекло пилеткой. Равномерно размазывают петлей каплю с микроорганизмами тонким слоем, высушивают на воздухе и фиксируют. Фиксация преследует следующие цели: убить микроорганизмы, т.е. сделать безопасным дальнейшее обращение с ними; обеспечить лучшее прилипание клеток к стеклу; сделать микроорганизмы более восприимчивыми к окраске, так как мертвые клетки окрещиваются лучше, чем живые.

Самым распространенным способом фиксации микроорганизмов является термическая обработка. Для этого высушенный препарат обычно трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. При исследовании строения микроорганизмов часто прибегают к фиксации клеток различными химическими веществами (спирт, осмиевая кислота, формалин и др.). Фиксирующую жидкость наливают на высушенный препарат, либо препарат на определенное время (3-15 мин) погружают в стакан с фиксатором.

Для окраски фиксированных микроорганизмов чаще всего используют анилиновые красители. Существуют простые и дифференциальные способы окрашивания микроорганизмов. При простой окраске прокрашивается вся клетка, так что становятся хорошо видны ее форма и размеры. Дифференциальная окраска предполагает окрашивание не всей клетки, а только определенных ее структур или включений. Для окрашивания клеток фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие над ковочкой, и заливают красителем на 1-15 мин. Следят за тем, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал. В случае необходимости на мазок наливают новые порции красителя. По окончании окраски препарат промывают водой, высушивают, помещают на окрашенный мазок каплю иммерсионного масла и просматривают с объективами 90x или 100x.

Задание. Приготовить фиксированные препараты и окрасить фуксином клетки следующих микроорганизмов: палочковидные бактерии - *Pseudomonas alcaligenes*; изогнутые и ветвящиеся бактерии - *Mycobacterium flavescens*, *Nocardia sp.*; мицелиальные формы, образующие экзоспоры - *Streptomyces sp.*; бактерии, образующие выросты - *Caulobacter crescentus* (стебельки) и простеки - *Rhodospirillum rubrum*. Просмотреть и зарисовать микроорганизмы, отметить форму и сочетание клеток. (Вместо указанных видов могут быть использованы другие микроорганизмы с соответствующей морфологией, в частности, в виде готовых препаратов).

Задание на дом. Практикум по микробиологии (2005), с. 74-81; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с. 104-111 (1995), с. 59-68 (1983).

ЗАНЯТИЕ 3

Тема: Микроскопические методы исследования микроорганизмов

Обнаружение капсул методом негативного контрастирования.

Небольшое количество клеток *Azotobacter chroococcum* с твердой питательной среды помещают петлей на предметное стекло в каплю водопроводной воды, смешивают с каплей туши,

накрывают покровным стеклом и просматривают с объективом 40x. При этом на общем сером фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки.

Окраска эндоспор

Небольшое количество клеток *Bacillus cereus* или другого вида спорообразующих бактерий с твердой среды помещают петлей на предметное стекло в каплю водопроводной воды и делают мазок. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло пинцетом над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски трехкратная, по 10-15 сек. Затем предметное стекло охлаждают, препарат тщательно промывают над эксикатором водой, после чего клетки в течение 30 сек докрашивают 0,5% водным раствором сафранина. Краситель сливают, препарат промывают водой, сушат и просматривают с иммерсионной системой (90x-100x). При правильной окраске вегетативные клетки имеют красный, а споры синий цвет. Вместо метиленового синего можно использовать другой краситель, например, малахитовый зеленый. В этом случае после фиксации препарат заливают на 7-10 мин 7,5% раствором малахитового зеленого. Окраску проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой, и докрашивают клетки 0,25% водным раствором сафранина в течение 1-2 мин. Эндоспоры можно также обнаружить с помощью фазово-контрастной микроскопии или методом простого окрашивания (например, фуксином). Они обнаруживаются в клетке в виде бесцветных включений.

Выявление включений полифосфатов (син. волютин, метахроматин).

Метод окраски основан на свойстве метахромазии - изменении цвета некоторых красителей (например, метиленового синего) при взаимодействии с определенным компонентом клетки. Готовят тонкий мазок клеток *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки, заливают раствором метиленового синего по Леффлеру и окрашивают в течение 10-15 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе и просматривают с иммерсионной системой (90x-100x). При этом клетки окрашиваются в голубой цвет, а гранулы полифосфатов в фиолетово-красный.

Выявление включений гликогеноподобных полисахаридов

К капле суспензии клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом 40x. Включения гликогеноподобного полисахарида окрашиваются в красно-коричневый цвет.

Выявление включений серы

Благодаря двойному светопреломлению включения серы хорошо заметны в клетках *Beeggiatoa* sp., *Chromatium minutissimum* или некоторых других бактерий без специального окрашивания, для чего необходимо приготовить препарат "раздавленная капля" и промикроскопировать его, пользуясь объективом 40x.

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с. 31-36; 45-54, Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с. 29-56 (1995), с. 69-98 (1983).

ЗАНЯТИЕ 4

Тема: Приготовление питательных сред и методы стерилизации

Для выращивания микроорганизмов применяют разнообразные по составу питательные среды. Широко используются среды на основе мясо-пептонного бульона (МПБ) и (или) ячменного сусла. На таких средах растут многие микроорганизмы, хотя и не все.

Среды для культивирования, а также посуда, пипетки и другие предметы, используемые при работе с микроорганизмами, должны быть стерильными. Существуют разные способы стерилизации. Наиболее часто используется термическая стерилизация в автоклавах и (или) сушильных шкафах.

Цель занятия 4: приготовление питательной среды для выращивания микроорганизмов, знакомство с методами стерилизации сред, посуды и инструментов.

Задание 1. Приготовить по 150-200 мл питательной среды (БСА), содержащей мясо-пептонный бульон (МПБ) и 4°Б (с концентрацией сахара 4 градуса, определенной с помощью ареометра Баллинга) неохмеленное пивное сусло (в соотношении 1:1) с 2% агара. Среду готовят в колбе объемом 300-700 мл. Колбу с готовой средой ставят в кипящую водяную баню. После того, как агар расплавится и среда станет гомогенной, ее разливают в 7-8 широких пробирок (по 20 мл) и в 5-8 узких пробирок (по 5 мл). Пробирки с питательной средой закрывают ватными пробками и сдают на стерилизацию в автоклаве при 0,5 ати. Среду после стерилизации используют при дальнейшей работе с микроорганизмами.

Задание 2. Налить водопроводную воду в 4-5 узких пробирок (по 10 мл). Пробирки закрывают ватными пробками и сдают на стерилизацию в автоклаве при 1 ати. Стерильную воду используют затем для приготовления суспензий микроорганизмов.

Задание 3. Подготовить к стерилизации сухим жаром: чашки Петри - 9 штук (по 3 в пачку); пипетки на 1-2 мл - 4-5 штук; на 5 мл - 1-2 штуки; пробирки обычные - 4 штуки; стеклянные шпатели (Дригальского) - 2 штуки. Посуду и инструменты стерилизуют в сушильном шкафу при 165-170° С в течение 2 часов.

Задание 4. Сделать ватно-марлевые пробки для нескольких пробирок.

Задание 5. Познакомиться с устройством автоклава.

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с. 36-45; 93-101; 159-167. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с. 56-80 (1995), с. 99-115, 147-153 (1983).

ЗАНЯТИЯ 5-6

Тема: Получение накопительных и чистых культур микроорганизмов

Чистой, или аксенической, называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанных популяций, существующих в природе, и поддерживать чистоту культуры является важнейшим условием работы с микроорганизмами.

Выделение чистой культуры обычно включает три этапа:

1. Получение накопительной культуры;
2. Выделение чистой культуры;
3. Проверка чистоты выделенной культуры.

Цель занятий 5-6: Получение накопительной и чистой культуры микроорганизмов.

1. Получение накопительной культуры микроорганизмов

Накопительной называют такую культуру, в которой преобладают представители микроорганизмов, близких по своим свойствам или (в отдельных случаях) одного вида микроорганизмов. Метод накопительных культур был введен в практику микробиологических исследований Виноградским и Бейеринком. Сущность его заключается в создании селективных (избирательных) условий. При создании селективных условий учитывают особенности тех микроорганизмов, которые собираются выделять: требования к источникам питания, отношение к pH среды, аэрации, температуре, освещенности, устойчивости к антибиотикам и др. Чаще всего селективные условия создают путем подбора соответствующей для выделяемых микроорганизмов питательной среды. Селективные условия не всегда оптимальны для роста выделяемого микроорганизма, но они лучше переносятся им, чем сопутствующими формами.

Задание. Получить одну из накопительных культур следующих микроорганизмов:

1.1. Свободноживущие аэробные азотфиксирующие бактерии.

Используют среду Эшби, не содержащую соединений азота, (г/л): маннит -20,0; K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4$ - 0,2; NaCl - 0,2; K_2SO_4 - 0,1; $CaCO_3$ -5,0, агар - 20,0. Вода дистиллированная. Среду в колбе расплавляют на водяной бане, разливают в стерильные чашки Петри и дают остыть на горизонтальной поверхности. Затем, пользуясь стеклянным капилляром, смоченным в воде, раскладывают на поверхность среды в чашке (по трафарету) 15-25 комочков почвы величиной с булавочную головку. Чашку Петри закрывают и ставят в термостат (30° С) на 3-5 суток. Вместо агара в качестве уплотнителя среды можно также использовать силикагель. В этом случае готовят концентрированную среду Эшби, концентрация всех соединений в которой увеличивается в 10 раз. Этой средой пропитывают пластинки силикагеля (2-3 мл на чашку), подсушивают в сушильном шкафу (10-15 мин. при 60°С) и раскладывают комочки почвы.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры азотфиксирующих бактерий по образованию слизистых колоний (часто окрашенных при длительном росте в коричневый цвет) вокруг комочков почвы на чашках.

Микроскопируют накопительную культуру с использованием метода негативного контрастирования (см. занятие 3). Обнаруживают клетки бактерий (обычно представителей рода *Azotobacter* или *Beijerinckia*), окруженные слизистой капсулой.

1.2. Свободноживущие анаэробные азотфиксирующие бактерии.

Используют среду Виноградского следующего состава (г/л): глюкоза - 20,0; K_2HPO_4 -1,0; $MgSO_4$ -0,5; NaCl-0,5; $MnSO_4$ и $FeSO_4$ следы; $CaCO_3$ -20,0. Вода водопроводная. В высокие пробирки вносят небольшое (0,5-1,0 г) количество почвы, наливают среду Виноградского, оставляя воздушное пространство в 1 см между пробкой и средой, и пастеризуют в течение 10 мин при 80° С (в водяной бане). Пробирки помещают в термостат (30° С) на 7 суток. На этой среде, как правило, вырастают клостридии, обычно *Clostridium pasteurianum*.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры азотфиксирующих клостридий по газовыделению и запаху масляной кислоты (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру. Отмечают наличие подвижных палочек,

образующих споры. В клетках бактерий выявляют характерные гранулы крахмалоподобного вещества гранулезы. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом 40x. Включения гранулезы окрашиваются в синий цвет.

1.3. Аэробные спорообразующие бактерии.

Вариант 1. Нарезают неочищенный клубень картофеля на мелкие ломтики, помещают их в колбу объемом 100-150 мл, добавляют небольшое количество CaCO_3 (на кончике шпателя), заливают ломтики водопроводной водой (с таким расчетом, чтобы вода покрывала их примерно наполовину), закрывают колбочку ватной пробкой и прогревают в кипящей водяной бане 10-15 мин. При этом вегетативные клетки бактерий, находящихся на поверхности клубней картофеля, погибают, а жизнеспособными остаются лишь термостабильные споры. Колбы помещают в термостат (30°C) на 5-7 суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры спорообразующих бактерий (обычно рода *Bacillus*) по появлению на поверхности ломтиков картофеля и воды морщинистой пленки.

Для микроскопирования готовят препараты фиксированных окрашенных клеток. Отмечают наличие эндоспор. Для этого препарат фиксированных клеток окрашивают фуксином в течение 2-3 мин. Цитоплазма окрашивается в розово-красный цвет, а спора не окрашивается фуксином и видна в клетке в виде бесцветного включения. Можно также провести дифференциальную окраску спор и цитоплазмы (занятие 3).

Вариант 2. Помещают 1 г сена в колбочку объемом 100-150 мл и заливают 20-30 мл водопроводной воды, нагретой до $40-50^\circ\text{C}$. Сено настаивают в течение 30 мин, при этом из него экстрагируются вещества, которые служат питательным субстратом для бактерий. Через 30 мин сенной настой отделяют от сена, разливают в 4 пробирки (примерно по 5 мл), закрывают их ватными пробками и прогревают в кипящей водяной бане 15-20 мин. При этом лишь споры некоторых бактерий остаются жизнеспособными. Колбы помещают в термостат (30°C) на 7 суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры спорообразующих бактерий (обычно *Bacillus subtilis*) по наличию в накопительном материале эндоспор методом микроскопирования (см. вариант 1).

1.4. Уробактерии.

К 25 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) добавляют 2,5 г (10%) мочевины. Полученную среду разливают в обычные пробирки (по 5-6 мл) и инокулируют небольшим количеством навоза. В такой среде развиваются бактерии (обычно *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae* или *Proteus vulgaris*), способные разлагать мочевину с помощью уреазы согласно уравнению: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$. В результате pH среды повышается до тех значений (9-10), при которых сохраняют способность расти преимущественно уробактерии. Большинство других бактерий из-за высокого значения pH не растут. Для получения накопительной культуры уробактерий пробирки помещают в термостат (30°C) на 7 суток.

На следующем занятии проверяют присутствие накопительной культуры уробактерий по выделению аммиака и подщелачиванию среды (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру с фазово-контрастным устройством в препарате

"раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность, наличие в клетках спор (см. занятие 3).

1.5. Метилотрофы.

Метилотрофы, использующие метанол, легко выделяются из сточных вод и других источников, где этот субстрат часто присутствует. Для получения накопительной культуры метилотрофных бактерий используют синтетическую среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; NaCl - 0,5; MgSO_4 - 0,025; FeSO_4 - 0,01. Вода водопроводная. В качалочную колбу объемом 750 мл помещают 100 мл среды, 4 капли 10% -ого дрожжевого экстракта и 0,3% (по объему) метанола. С помощью 10% растворов NaOH и HCl доводят значение pH среды до 7,0. Затем вносят в колбу вносят 3-4 мл сточной жидкости или другой образец природного материала. Колбу помещают на качалку (200 об/мин) и оставляют при 30° С на несколько суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры метилотрофных бактерий по помутнению и часто появляющемуся розовому окрашиванию среды (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру в препарате "раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность.

1.6. Нитрифицирующие бактерии.

Используют среду Виноградского следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; K_2HPO_4 - 1,0; MgSO_4 - 0,5; FeSO_4 - 0,4; NaCl - 2,0. Вода водопроводная. Среду разливают в колбы объемом 50 мл по 15 мл в каждую (высота слоя среды должна быть 1,0-1,5 см). В каждую колбу вносят на кончике шпателя небольшое количество CaCO_3 . Посевным материалом служит почва. Колбы помещают в термостат на 30° С.

Через 1-3 недели проверяют получение накопительной культуры нитрификаторов по появлению в среде нитритов и (или) нитратов. Для их обнаружения проводят качественные реакции на нитриты с реактивом Грисса или с помощью крахмал-йодной реакции и на нитраты с дифениламином. Рост нитрифицирующих бактерий ведет также к подкислению среды.

Качественные реакции на нитриты.

- 1) Для обнаружения нитритов к капле реактива Грисса на керамической пластинке добавляют каплю выросшей жидкой культуры. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии нитритов.
- 2) Крахмал-йодная реакция основана на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, присутствие которого обнаруживают с крахмалом. Для проведения реакции к капле выросшей жидкой культуры на керамической пластинке добавляют каплю раствора, содержащего ZnCl_2 , KCl , крахмал и каплю 5% раствора HCl . При наличии в среде нитритов появляется синее окрашивание.

Качественная реакция на нитраты.

На белой керамической пластинке несколько кристаллов дифениламина растворяют в капле концентрированной серной кислоты и к смеси добавляют каплю исследуемой жидкой культуры. При наличии нитратов возникает синее окрашивание. Контролем служит исходная стерильная среда. Следует иметь в виду, что пробу на нитраты можно проводить только в отсутствие нитритов, так как последние тоже дают синее окрашивание с дифениламином.

Изменение значения pH среды определяют с помощью бромтимолблау (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру в препарате "раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий и их подвижность.

1.7. Денитрифицирующие бактерии.

Используют среду следующего состава (г/л): лимоннокислый калий или натрия (трехзамещенный)-5,0; KNO_3 -2,0; KH_2PO_4 -2,0; $MgSO_4$ -2,0; $CaCO_3$ -0,2; аспарагин-1,0; $FeCl_3$ (безводный)-0,05; вода водопроводная. Исходное значение pH среды - 6,8-7,2. Среду разливают в выглаженные пробирки, оставляя воздушное пространство в 1 см между пробкой и средой. Предварительно в каждую пробирку помещают стеклянный поплавочек (запаянным концом вверх), так, чтобы он был полностью заполнен средой. Посевной материал почва. Среда в одной пробирке оставляют незасеянной для контроля. Пробирки помещают в термостат (30° С) на 1-2 недели.

На следующем занятии проверяют рост накопительной культуры денитрифицирующих бактерий по газовыделению (пузырек воздуха в поплавке), отсутствию в среде нитратов, подщелачиванию среды (контролем служит исходная стерильная среда). О наличии или отсутствии нитратов судят по качественной реакции с дифениламином (см. получение накопительной культуры нитрифицирующих бактерий). Изменение pH среды определяют с помощью бромтимолблау.

Микроскопируют накопительную культуру в препарате "раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий и их подвижность.

1.8. Сульфатредуцирующие бактерии.

Используют среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 -0,5; NH_4Cl -1,0; $(NH_4)_2SO_4$ -7,0 или Na_2SO_4 -4,5; $CaCl_2$ -0,06; лактат натрия-6,0; лимоннокислый натрий (трехзамещенный)-0,3; $NaCl$ -5,0. Для удаления из среды растворенного кислорода ее кипятят в колбе в водной бане в течение 5 мин и затем осторожно охлаждают водой. После этого в среду вносят остальные компоненты в следующем порядке (мл/л): 1) 0,1% раствор $FeSO_4$ в 1%-ной HCl -10,0; 2) дрожжевой экстракт -10,0; 3) раствор микроэлементов (по Пфеннигу)-1,0.

Далее доводят значение pH до 7,0-7,5 с помощью 5% растворов $NaHCO_3$ и HCl и добавляют $Na_2S \cdot 9H_2O$ (5% раствор в 1% растворе $NaHCO_3$) по каплям до образования сероватого оттенка в среде. После этого в среду немедленно вносят посевной материал (почву), разливают доверху в пробирки и закрывают их резиновыми пробками. Пробирки помещают в термостат (30°С) на 7 суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий по выделению сероводорода, который, связываясь с присутствующим в среде железом, вызывает ее почернение (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру в препарате "раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, наличие спор (см. занятие 3) и подвижность.

1.9. Фототрофные пурпурные бактерии.

Пурпурные бактерии могут быть выделены из различных пресных и соленых водоемов. Для выделения несерных пурпурных бактерий готовят среду следующего состава (г/л): NH_4Cl -1,0;

K_2HPO_4 -0,5; MgCl_2 -0,5; микроэлементы по Пфеннигу -1 мл. К основному фону среды добавляют (г/л): NaHCO_3 -2,0; Na_2S -0,15; ацетат, лактат или малат натрия - 2,0, дрожжевой экстракт - 0,1. Исходное значение pH среды доводят до 7,0 с помощью 10%-ных стерильных растворов NaOH и H_3PO_4 .

В пробирку (или колбу) с притертой пробкой вносят 5-10% (по объему) посевого материала (воду или ил из различных водоемов) и доливают до пробки средой так, чтобы между средой и пробкой не оставалось воздушного пространства. Пробирки (или колбы) помещают в люминостат (800-1000 люкс, 28-30°C) на 1-2 недели.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры пурпурных бактерий по окрашиванию среды в розовый, красный или коричневатый цвет, благодаря наличию большого количества каротиноидов.

Микроскопируют накопительную культуру в препарате "раздавленная капля". Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность.

1.10. Микроорганизмы, использующие углеводороды.

Используют среду следующего состава (г/л): KNO_3 - 4,0; KH_2PO_4 - 0,6; Na_2HPO_4 - 1,4; MgSO_4 - 0,8; вода водопроводная. Исходное значение pH среды доводят до 6,8-7,2 растворами NaOH и HCl (проверяют по бромтимолблау). В две качалочные колбы объемом 750 мл помещают по 100 мл среды. В одну из колб вносят около 1 г почвы, отобранной у бензоколонки и 2 мл керосина, а в другую такое же количество почвы и 2 мл вазелинового масла. Колбы закрывают ватными пробками и помещают на качалку (220 об/мин) при 30°C на 5-7 суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры углеводородокисляющих микроорганизмов по помутнению среды и наличию пленки на ее поверхности (контролем служит исходная стерильная среда).

Микроскопируют накопительную культуру в препаратах "раздавленная капля" и фиксированных окрашенных (фуксином) клеток. Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность.

1.10. Аммонифицирующие бактерии.

Для получения накопительной культуры используют мясо-пептонный бульон. 30 мл среды наливают в колбу емкостью 100 мл, добавляют 0,3 г почвы и закрывают ватной пробкой. Для обнаружения аммиака над средой в колбе между стенкой и пробкой подвешивают красную лакмусовую бумажку, смоченную дистиллированной водой (бумажка не должна касаться среды). Сверху колбочку закрывают пергаментной бумагой и ставят в термостат (30°C) на 4-6 суток.

На следующем занятии проверяют получение накопительной культуры аммонифицирующих бактерий по посинению лакмусовой бумажки и запаху сероводорода.

Микроскопируют накопительную культуру в препаратах "раздавленная капля" и фиксированных окрашенных (фуксином) клеток. Отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность.

Свойства полученных накопительных культур бактерий обобщают в таблице 1.

Таблица 1. Свойства накопительной культуры бактерий.

Среда	Культуральные признаки	Морфология клеток
-------	------------------------	-------------------

2. Выделение чистых культур микроорганизмов.

Для выделения чистых культур микроорганизмов из накопительных обычно используют метод Коха. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Выделение чистых культур аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов проводят, рассеивая накопительную культуру на поверхность твердой питательной среды. Выделение строго анаэробных микроорганизмов осуществляют высевом в толщу расплавленной среды в пробирках, трубках Бурри или помещением чашек Петри, засеянных микроорганизмами, в анаэрокат. Их выделение в виде чистых культур обычно более сложно, чем микроорганизмов, растущих в аэробных условиях, и требует значительно большего времени.

В зависимости от свойств накопительных культур микроорганизмов для получения отдельных колоний используют разные среды.

1/ Споровых аэробных бактерий – БСА (МПА с суслон, 1:1, + 2% агара).

2/ Денитрифицирующих бактерий - БСА.

3/ Уробактерий - МПА с 2% мочевины.

4/ Метилотрофных бактерий - агаризованную среду с метанолом.

5/ Углекислородокисляющих бактерий – БСА.

6/ Азотфиксирующих аэробных бактерий - агаризованную среду Эшби.

7/ Аммонифицирующих бактерий - МПА.

Посев проводят бактериологической петлей методом "истощающего штриха". Чашки с посевами бактерий (крышками вниз) помещают в термостат (30°) на 4-6 суток.

На следующем занятии выбирают и описывают 2 изолированные колонии микроорганизмов, выросших на поверхности питательных сред.

Расплавляют на кипящей водяной бане соответствующие стерильные среды в пробирках (по 1-2 пробирки каждой среды) для разных бактерий (см. 2.1). Скашивают среды и делают посев в них из 2-х описанных колоний микроорганизмов. Посев проводят штрихом бактериологической петлей, простерилизованной в пламени горелки. Помещают в термостат (30°C) на 3-5 суток.

После того, как культуры в пробирках вырастут, проверяют чистоту выделенных культур визуально (однородный рост по всему штриху) и микроскопированием (чистые культуры многих бактерий морфологически однородны, допустимо лишь некоторое варьирование размеров клеток). Необходимо также провести рассев на твердую среду (БСА) в чашки Петри. Однородность колоний и совпадение их признаков с описанными ранее свидетельствует о чистоте культуры. Но следует иметь в виду, что некоторые виды бактерий могут образовывать колонии разной морфологии в результате процесса диссоциации.

Задание на дом. Практикум по микробиологии (2005), с.114-117; 132-142; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с.151-155 (1995), с.116-119 (1983).

ЗАНЯТИЕ 7

Тема: Идентификация микроорганизмов

Определение (идентификация) микроорганизмов базируется на изучении их морфологических, цитологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств. Большое значение приобрели методы, основанные на изучении нуклеиновых кислот, такие, как определение содержания ГЦ в ДНК, последовательность нуклеотидов в 5S, 16S рРНК и

гибридизация ДНК/ДНК. Это привело к существенным изменениям в классификации микроорганизмов. Однако с практической точки зрения важно, чтобы число тестов для идентификации микроорганизмов по имеющимся определителям было минимальным, а сами тесты максимально информативны. При идентификации микроорганизмов необходимо соблюдать следующие правила:

- использовать чистые культуры;
- применять при изучении свойств микроорганизмов стандартные методы;
- использовать микроорганизмов в активном физиологическом состоянии.

Цель занятий 7-10: знакомство с основными принципами определения микроорганизмов.

В процессе выполнения работы каждый студент изучает некоторые свойства бактерий, необходимые для составления паспорта штамма бактерии и идентификации его до уровня рода.

1. Определение чистоты идентифицируемой бактерии и изучение морфологии клеток.

Для проведения работы по идентификации микроорганизмов каждый студент получает одну культуру бактерий (на скошенной агаризованной среде в пробирке), которую затем проверяет на чистоту. Это осуществляют несколькими способами: визуально, высевом на питательные среды и микроскопией.

Просматривают характер роста полученной бактерии по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, то культура загрязнена. Затем культуру отсевают в пробирку на скошенную среду (МПА, БСА) для использования в дальнейшей работе, а также делают рассев на поверхность твердой среды в чашке Петри методом истощающего штриха для проверки на чистоту (по однородности выросших колоний). Засеянные пробирки и чашки помещают в термостат (30°C) на 2-3 дня. Остаток исходной культуры бактерии в пробирке используют для проверки на чистоту методом микроскопии (по морфологической однородности популяции), а также изучения формы, взаимного расположения, подвижности клеток и их размеров. Микроскопируют культуру с использованием препаратов раздавленная капля и препарата фиксированных, окрашенных фуксином клеток (см. занятия 1 и 2). Результаты вносят в таблицу 2.

Таблица 2. Свойства идентифицируемой бактерии

Признаки	Результаты
Описание колонии	
Форма	
Размер, мм	
Цвет	
Край	
Блеск	
Поверхность	
Профиль	
Рисунок	
Морфология клеток и цитология	
Форма и расположение клеток	
Подвижность	
Наличие эндоспор	
Окраска по Грамму	
Окраска на кислотоустойчивость	

Физиолого-биохимические свойства	
Рост на среде с глюкозой	
Протеолитическая активность:	
Рост на среде с желатиной	
Рост на среде с молоком	
Амилазная активность:	
Рост на среде с крахмалом	
Тест на каталазу	
Тест на оксидазу	
Чувствительность к антибиотикам	

2. Культуральные свойства.

На следующем занятии просматривают чашку Петри, засеянную суспензией идентифицируемой бактерии. Критерием чистоты культуры (при отсутствии диссоциации) является однородность выросших колоний. Описывают культуральные (макро-морфологические) свойства бактериальных колоний и результаты вносят в таблицу 2.

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с.118-129; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с.155 -167 (1995), с.120 -129 (1983).

ЗАНЯТИЕ 8

Тема: Идентификация микроорганизмов (продолжение):

3. Изучение цитологических свойств идентифицируемых бактерий.

3.1. Наличие эндоспор.

Наличие эндоспор в клетках определяют, как описано выше (см. занятие 3).

3.2. Окраска по Граму.

На обезжиренном предметном стекле в каплях воды делают мазки трех микроорганизмов: в центре готовят мазок клеток исследуемой бактерии, а слева и справа контрольных бактерий. Клетки одной из контрольных бактерий должны быть грам-положительными, например, *Micrococcus luteus*, другой – грам-отрицательными, например, *Escherichia coli*.

Мазки следует готовить тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1-2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым. Затем краситель сливают и обрабатывают 1-2 мин раствором Люголя до почернения. Сливают раствор Люголя, препарат обесцвечивают 0,5-1,0 мин 96%-ным этиловым спиртом, быстро промывают водой и дополнительно окрашивают 1-2 мин водным фуксином. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании грам-положительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грам-отрицательные розово-красный цвет.

Для получения достоверных результатов необходимо готовить мазки для окраски по Граму из молодых, активно растущих (обычно односуточных) культур, так как клетки из старых культур иногда дают неустойчивую реакцию по Граму. Грам-отрицательные бактерии могут выглядеть как грам-положительные, если бактериальная пленка (мазок) слишком толста и обесцвечивание спиртом не проведено до конца. Грам-положительные бактерии могут выглядеть как грам-отрицательные, если мазок переобесцвечен спиртом.

Для сравнения можно использовать ускоренный тест для определения принадлежности

бактерий к грам-положительным или грам-отрицательным видам. Для этого исследуемую культуру бактерий с помощью петли переносят с твердой среды на предметное стекло в каплю 3%-ного раствора КОН и тщательно перемешивают. Через 10 сек петлю поднимают над петлей. Для грам-отрицательных бактерий характерно образование слизи, которая тянется за петлей на 0,5-1,0 см. Если образование слизи не наблюдается, бактерии относятся к грам-положительным. Образование слизи происходит в результате разрушения клеточных стенок грам-отрицательных бактерий и выхода из них нуклеиновых кислот.

3.3. Окраска на кислотоустойчивость.

На обезжиренном предметном стекле в каплях воды готовят два мазка: исследуемой бактерии и кислотоустойчивых микобактерий (*Mycobacterium flavescens*). Препараты высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препараты карболовым фуксином Циля и 2-3 раза подогревают их до появления паров, держа предметное стекло с помощью пинцета высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку, и при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. Дают препаратам остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазки промывают водой. Затем клетки обесцвечивают 5%-ным раствором H_2SO_4 . Для этого предметное стекло погружают 2-3 раза в стакан с серной кислотой, не задерживая его в ней. Препарат вновь тщательно промывают водой и докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (по Леффлеру). Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают и рассматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании кислотоустойчивых бактерий клетки имеют красный цвет, а некислотоустойчивые синий.

4. Изучение физиолого-биохимических свойств идентифицируемых бактерий

4.1. Рост на среде с глюкозой.

Культуру вносят стерильной петлей в жидкую среду, содержащую (г/л): пептон-5,0; K_2HPO_4 -1,0; глюкоза-10,0; бромтимолблау-2 мл (1,6%-ного спиртового раствора), вода дистиллированная, разлитую в пробирки (по 8-10 мл) с поплавками. Продолжительность культивирования 7 суток в термостате на $30^\circ C$. Рост микроорганизмов или его отсутствие определяют по помутнению среды, образованию пленки или осадка. Изменение цвета индикатора (бромтимолблау) указывает на образование кислых (желтая окраска среды) или щелочных (синяя окраска среды) продуктов метаболизма. Об образовании газа свидетельствует накопление его в поплавке. Результаты наблюдений сравнивают со стерильной средой.

4.2. Рост на среде с желатиной.

Активность у микроорганизмов внеклеточных протеолитических ферментов определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин или другие белки. Среда с желатиной состоит из МПБ и 10-15% желатины (МПЖ). Посев проводят уколом. Бактериологической иглой стерильно отбирают клетки микроорганизмов с косяка и вводят иглу в толщу столбика МПЖ до дна пробирки. Продолжительность культивирования 7-10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины или его отсутствие отмечают визуально.

4.3. Рост на среде с молоком.

Высев на "молочный агар" в чашки Петри производят для определения способности бактерий разлагать казеин молока. Среда состоит из равных частей стерильного обезжиренного

молока и 3%-ного водного агар-агара. Бактерии высевают петлей, проводя штрих по диаметру чашки или по центру сектора, на которые разделена чашка. Продолжительность культивирования бактерий в термостате при 30° С 7 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колоний или выросшей по штриху культуры микроорганизмов. Особенно четко зона видна после обработки среды с выросшими бактериями раствором 5%-ной трихлоруксусной кислоты. Зону гидролиза казеина измеряют в мм от края штриха или колонии до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше казеинолитическая активность бактерий.

4.4. Рост на среде с крахмалом.

Высев на агаризованную среду с крахмалом (в чашки Петри), содержащую (г/л): пептон, KH_2PO_4 -5,0; растворимый крахмал -2,0; агар-15,0; рН=6,8-7,0 производят для определения образования микроорганизмами амилазы. Бактерии высевают петлей, проводя штрих по диаметру чашки или по центру сектора, на которые разделена чашка. Продолжительность культивирования бактерий 7 суток в термостате при 30°С. Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки среды с выросшими бактериями раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливают 3-5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизировался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряют в мм от края штриха до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше активность амилазы.

4.5. Тест на каталазу.

Часть выросшей культуры суспензируют с помощью бактериологической петли в капле 3%-ной перекиси водорода на предметном стекле. О наличии каталазы свидетельствует образование пузырьков газа, наблюдаемое через 1-5 мин после внесения бактерий невооруженным глазом или в микроскопе при малом увеличении. Можно нанести несколько капель перекиси водорода непосредственно на колонию или культуру на скошенном агаре и наблюдать выделение молекулярного кислорода.

4.6. Тест на оксидазу.

Наносят несколько капель 1%-ного свежеприготовленного раствора солянокислого тетраметил-п-фенилендиамина на отрезок фильтровальной бумаги. Суточную культуру бактерий распределяют по поверхности увлажненной этим раствором бумаги. При положительной реакции через 10-20 сек развивается фиолетовая или пурпурная окраска.

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с.129-132; 159-167; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с.167-171 (1995), с.129-132 (1983).

ЗАНЯТИЕ 9

Тема: Идентификация микроорганизмов (продолжение):

5. Учесть результаты опытов по изучению физиологических и биохимических свойств бактерий, проведенных на предыдущем занятии, и внести в таблицу 2.

6. Определение чувствительности бактерии к антибиотикам.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам можно проводить методом агаровых блочков и с помощью бумажных дисков, пропитанных разными антибиотиками. Для этого готовят в стерильной водопроводной воде густую суспензию изучаемого микроорганизма путем смыва клеток водой с поверхности твердой питательной среды (косячка).

Работая около пламени горелки, вносят по 3-5 капель полученной суспензии в пробирку с предварительно расплавленной и остуженной до 45-50° С питательной средой (БСА). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри.

В качестве продуцентов антибиотиков используют бактерии рода *Streptomyces* (табл. 3). Продуценты антибиотиков предварительно выращивают на агаризованных средах в чашках Петри сплошным газоном. Стерильным пробочным сверлом (диаметр 6-8 мм) вырезают блочки с газона микроорганизма и переносят их на поверхность застывшей среды, засеянной изучаемой бактерией. Бумажные диски, пропитанные разными антибиотиками (выдает лаборант), помещают на поверхность засеянной бактерией среды на равном расстоянии друг от друга и на 1,5-2,0 см от края чашки.

Чашки Петри, не переворачивая, помещают в термостат (30° С) на 24 часа. Через сутки отмечают образование зон подавление роста исследуемых микроорганизмов вокруг агаровых блочков и дисков. Если бактерия чувствительна к определенным антибиотикам, то вокруг блочков или дисков обнаруживаются зоны отсутствия роста культуры. Диаметр зоны подавления роста измеряют и записывают результат в таблицу 3. Зона более 30 мм свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизма к антибиотику, а менее 12 мм - о слабой.

Таблица 3. Действие антибиотиков на рост бактерии.

Антибиотик	Диаметр зон подавления роста, мм
Диск с пенициллином	
Диск с левомицетином	
Блок с <i>S. violaceus</i> (мицетин)	
Блок с <i>S. anulatus var. griseus</i> (стрептомицин)	
Блок с <i>S. anulatus var. spheroides</i> (новобиоцин)	
Блок с <i>S. anulatus var. chrysomallus</i> (актиномицин)	

Задание на дом: Практикум по микробиологии (2005), с. 101-113; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, с. 117-132 (1995), с. 132-147 (1983).

ЗАНЯТИЯ 10 - 11

Тема: Идентификация микроорганизмов (продолжение)

7. **Оформить сводную таблицу** о свойствах изучаемой бактерии.

8. **Провести идентификацию изучаемой бактерии** по определителю Берги. Результаты определения и таблицу со свойствами бактерии сдать преподавателю.

Тема: Методы количественного учета микроорганизмов

Количество микроорганизмов в единице объема можно определить как методом непосредственного подсчета клеток под микроскопом (в счетных камерах, на фиксированных препаратах, в капиллярах, на мембранных фильтрах), так и путем учета роста микроорганизмов на питательных средах (метод Коха, метод предельных разведений). Часто о росте микроорганизмов судят по количеству образованной биомассы, которую определяют взвешиванием, по количеству белка, нефелометрическим методом.

Цель занятия: Сравнить разные методы количественного учета микроорганизмов.

1. Метод Коха.

Расплавляют в кипящей водяной бане 20 мл ранее приготовленной стерильной среды

(БСА) в трех пробирках и разливают ее в три стерильные чашки Петри около пламени горелки. После того, как среда застынет, делают высев из полученной от преподавателя культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для определения числа живых клеток. С этой целью готовят разведения исходной культуры в десять и сто раз в стерильной водопроводной воде. Для этого стерильной пипеткой 1 мл исходной культуры вносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Суспензию этого разведения (1:10) тщательно перемешивают с помощью новой стерильной пипетки, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру повторяют 3-5 раз, что обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем новой стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии полученного разведения и переносят во вторую пробирку получая 2 разведение 1:10. Производят посев из исходной культуры и полученных разведений путем нанесения каждый раз новой стерильной пипеткой по 0,1 мл суспензий (предварительно тщательно размешанной) на поверхность агаровых пластинок в чашках Петри. Посевной материал тщательно распределяют по поверхности агаризованной среды стерильными шпателями Дригальского. Для исходной культуры и полученных разведений берут каждый раз новый стерильный шпатель.

Чашки Петри и пробирки, засеянные микроорганизмами, помещают в термостат (30°C) на 3-5 дней. Чашки Петри инкубируют в термостате крышками вниз.

На следующем занятии подсчитывают число колоний *S. cerevisiae* в чашках Петри, и делают пересчет для определения общего числа живых клеток в 1 мл суспензии по формуле:

$$M = a \times 10^n / V$$

где: **M** - количество клеток в 1 мл;
a - среднее число колоний при высеве данного разведения;
10 - коэффициент разведения;
n - порядковый номер разведения, из которого сделан посев;
V - объем суспензии, взятый для посева

2. Нефелометрический метод.

Плотность клеток *S. cerevisiae* в жидкой среде определяют нефелометрически (ФЭК), используя кювету с длиной оптического пути 0,5 см и зеленый светофильтр ($\lambda = 540$ нм). Для получения достоверных результатов плотность клеток должна быть в пределах 0,1-0,6. При концентрациях клеток выше 0,6 происходит вторичное рассеяние света, что приводит к получению заниженных результатов. Поэтому суспензии больших плотностей перед измерением следует разводить водой в 2, 4, 6, 8 и 10 раз. Результаты измерений оптической плотности каждой суспензии (против воды) записывают в таблицу 4.

3. Подсчет клеток в камере Горяева-Тома.

Для перехода от показаний фотозлектроколориметра (ФЭК) к количеству клеток микрорганйзмов в среде подсчитывают их число, пользуясь счетной камерой Горяева-Тома и разведениями суспензии дрожжей, которые использовали для определения их плотности нефелометрическим методом. Клетки подсчитывают в больших квадратах сетки, пользуясь объективом 8x. Общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 800. Количество клеток в 1 мл соответствующей суспензии рассчитывают по формуле: $M = 1000 \times a \times n / h \times S$,

где: **M** - число клеток в 1 мл суспензии;
a - среднее число клеток в большом квадрате сетки;
h - глубина камеры (1/10 мм);

S - площадь большого квадрата сетки ($1/25 \text{ мм}^2$);
 n - степень разведения суспензии;
 1000 мм^3 - 1 мл.

Полученные результаты, выраженные в млн клеток в 1 мл, записывают в таблицу 4.
Таблица 4. Количество клеток дрожжей в суспензиях, установленное с помощью камеры Горяева, и соответствующие показания ФЭК.

Показатели	№ суспензии						
	1	2	3	4	5	6	И т.д.
Кол-во клеток, в млн/мл (М)							
Показания ФЭК							

4. Построить калибровочную кривую на основании данных табл. 4, откладывая на оси абсцисс количество клеток дрожжей, а на оси ординат оптическую плотность соответствующей суспензии. Калибровочную кривую строят для быстрого определения количества клеток определенного вида микроорганизмов по показаниям ФЭК.

5. Сравнить количество клеток дрожжей в 1 мл, определенное подсчетом в камере Горяева (табл.4) и методом Коха. Сделать вывод о соотношении живых и мертвых клеток дрожжей в исходной суспензии.

Сдать зачет по курсу практических занятий (темы 1-5).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология // М.; Изд-во МГУ.- 1992, 2004.
2. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. М.: Книжный дом "Университет". – 2001.
3. Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты. М.; Изд-во МГУ.- 1996.
4. Краткий определитель бактерий Берги // М.; "Мир".-1980.
5. Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. // М.: МАКС Пресс. –2003.
6. Методы общей бактериологии (под ред. Герхарда Ф.) // М.; "Мир".-1984 (в 3 томах).
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии (под ред. Звягинцева Д.Г.) //М.; МГУ.-1991.
8. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. М.: Академия. – 2006.
9. Определитель бактерий Берджи // М.; «Мир» – 1997 (в 2 томах).
10. Пиневиц А.В. Биология прокариотов. С-Пб. – 2006 (в 3 томах).
9. Практикум по микробиологии (под редакцией Нетрусова А.И.) // М.: Академия.- 2005.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под ред. Егорова Н.С.) // М.; Изд-во МГУ.- 1983, 1995.
11. Современная микробиология. Прокариоты. М.: Мир. 2005. (в 2 томах).
11. Стейниер Р., Здельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов // М.: "Мир". 1979 (в 3 томах).
12. Шлегель Г. Общая микробиология // М.: "Мир".-1987.
13. Экология микроорганизмов (под ред. Нетрусова А.И.). М.: Академия, 2004.