
РУКОВОДСТВО

**К ПРАКТИЧЕСКИМ
ЗАНЯТИЯМ
ПО МИКРО-
БИОЛОГИИ**



О Г Л А В Л Е Н И Е

РУКОВОДСТВО

К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

3-е издание, переработанное и дополненное

Под редакцией *Н. С. Егорова*

Рекомендовано Госкомитетом Российской Федерации по высшему образованию в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология» и специальностям «Биология» и «Микробиология»



ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1995

ББК 28.4
Р 85
УДК 576.8 (075.8)

Авторы:

М. Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина, Л. Г. Азова,
А. И. Нетрусов, Е. В. Семенова, Н. Н. Колотилова,
Л. М. Захарчук, В. В. Зинченко, С. И. Мыльникова,
М. В. Нефелова, И. В. Ботвинко

Рецензенты:

кафедра микробиологии ТСХА (зав. кафедрой В. К. Шильникова)

Федеральная программа книгоиздания России

Руководство к практическим занятиям по микробиологии:
Р 85 Учеб. пособие / Под ред. Н. С. Егорова. — 3-е изд., перераб.
и доп. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.: ил.
ISBN 5-211-03358—2

В «Руководстве к практическим занятиям по микробиологии» сохранена общая структура предыдущего издания (1-е изд. вышло в 1971 г., второе — в 1983). Существенно переработаны главы об общей характеристике микроорганизмов, их морфологии; включены новые главы о генетике, химическом составе клеток, систематике и идентификации микроорганизмов; с учетом последних достижений в области микробиологии пересмотрены и другие разделы учебного пособия. В книге приведены обобщенные данные отличительных признаков эукариотических и прокариотических организмов, типы энергетического и конструктивного метаболизма.

Р 1905000000 (4309000000) — 015 75—95
077(02)—95

ББК 28.4

ISBN 5-211-03358—2

© Коллектив авторов, 1995 г.

Идея создания руководства к практическим занятиям по микробиологии принадлежит академику В. Н. Шапошникову, возглавлявшему в течение 29 лет кафедру микробиологии Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, и доценту А. Я. Мантейфель, которая длительное время работала на той же кафедре и была автором первых программ малого практикума для студентов. Однако при их жизни этот замысел не был осуществлен. Авторы настоящего пособия — ученики В. Н. Шапошникова и А. Я. Мантейфель — сочли своим долгом создать такое руководство, отразив в нем присущий школе академика В. Н. Шапошникова физиологический подход к изучению микроорганизмов.

В процессе подготовки книги был использован многолетний педагогический опыт кафедры микробиологии МГУ, где слушают теоретический курс и выполняют практические занятия по микробиологии все студенты-биологи 3-го года обучения. Различие в объеме и содержании лекционных курсов для студентов разных специальностей потребовало создания отдельных программ практических занятий. Для студентов-микробиологов малый практикум по микробиологии — это лишь первый этап знакомства с миром микроорганизмов, после чего они на 4-м курсе выполняют задачи большого практикума. Студентам других специальностей практические занятия по микробиологии послужат основой для получения навыков работы с микроорганизмами.

При составлении руководства авторы исходили также из принятого на кафедре микробиологии МГУ метода проведения практических занятий, в основе которого лежит принцип самостоятельной работы студентов.

Авторы выражают надежду, что предлагаемое руководство может быть полезным не только студентам университетов, но и студентам других учебных заведений, изучающим микробиологию, а также специалистам смежных областей, которым приходится работать с микроорганизмами.

ПРЕДИСЛОВИЕ К ТРЕТЬЕМУ ИЗДАНИЮ

Современное развитие биологии и биотехнологии, в которых существенную роль играет микробиология, ставит задачу познания микроорганизмов и методов работы с ними перед специалистами, занимающимися не только микробиологией, но и генетикой, молекулярной биологией, биохимией, а также занятыми в других об-

ластях науки. За двенадцать лет после выхода в свет второго издания книги «Руководство к практическим занятиям по микробиологии» (Изд-во МГУ, 1983) появились новые данные о микроорганизмах и методах работы с ними, что и отражено в 1-й главе книги. Включена глава по генетике микроорганизмов, изменения и дополнения внесены в другие главы.

Из коллектива авторов 1-го и 2-го изданий ушла из жизни Л. Г. Азова, не работают на кафедре микробиологии МГУ М. Н. Пименова и Н. Н. Гречушкина, однако их вклад в написание книги и их основные идеи сохранены в новом издании. Над подготовкой 3-го издания руководства работали сотрудники кафедры микробиологии МГУ: И. В. Ботвинко, Л. М. Захарчук, В. В. Зинченко, Н. Н. Колотилова, С. И. Мыльникова, А. И. Нетрусов, М. В. Нефелова, Е. В. Семенова. Большую помощь в разработке отдельных задач практикума оказали И. Б. Наумова, В. В. Асеев, М. В. Гусев, М. Б. Куплетская, Е. Н. Красильникова, за что авторы им очень признательны.

Коллектив авторов, работавших над 3-м изданием руководства, выражает глубокую благодарность заведующему кафедрой микробиологии МГУ академику РАН профессору Е. Н. Кондратьевой за поддержку инициативы в переиздании этого учебного пособия и ценные советы и замечания при его подготовке.

Н. С. Егоров.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы — это мельчайшие живые существа, величина которых в большинстве случаев не превышает 0,1—0,2 мм, что делает их невидимыми для человеческого глаза без увеличения. Мир микробов, населяющих нашу планету, велик и разнообразен. Они различаются между собой морфологически, а также физиологическими и биохимическими свойствами. По принципу клеточной организации все микроорганизмы могут быть разделены на два типа — прокариоты и эукариоты. У прокариот ядерный аппарат, называемый часто нуклеоидом, представлен кольцевой молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. У эукариот ядро содержит набор хромосом и отделено от цитоплазмы мембраной. Различия в организации ядерного аппарата коррелируют с рядом других особенностей эу- и прокариот (табл. 1). Первоначально к микроорганизмам относили и вирусы, однако в настоящее время их чаще рассматривают как особые формы жизни, не имеющие клеточного строения и содержащие, в отличие от про- и эукариот, лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК).

Таблица 1

Некоторые отличительные признаки эукариот и прокариот

Характеристика	Прокариоты	Эукариоты
1	2	3
Цитологические признаки		
Наименьший размер клетки — 0,2 мкм	+	—
Наличие оформленного ядра	—	+
Наличие автономных органелл (митохондрии, хлоропласты)	—	+
Локализация рибосом:		
распределены в цитоплазме	+	—
прикреплены на эндоплазматическом ретикулуме	—	+
Жгутики (если присутствуют):		
диаметр 0,01—0,02 мкм, формула среза 8+1	+	—
диаметр около 0,2 мкм, формула среза 9+2	—	+
Молекулярно-биологические особенности		
Число хромосом	1	>1
Кольцевая хромосома	+	—

1	2	3
Линейные хромосомы	—	+
Константы седиментации рибосом		
70S	+	—
80S	—	+
Константы седиментации рибосомной РНК		
5S, 16S, 23S	+	—
5S, 5,85S, 18S, 28S	—	+
Признаки, основанные на химических анализах		
Присутствие пептидогликана	+(—)	—
Особенности размножения		
Клеточное деление происходит в результате митоза	—	+
Возможность мейоза	—	+
Перенос генов и рекомбинация включают гаметогенез и образование зигот,	—	+
Питание		
Диффузия или транспорт через мембрану	+	+
Эндоцитоз	—	+
Метаболические особенности		
Дыхательный и фотосинтезирующий аппарат ассоциирован с плазматической мембраной или ее выростами	+	—
Возможность хемолитотрофного метаболизма	+	—
Способность к фиксации молекулярного азота	+	—
Способность к метаногенезу	+	—
Способность к аноксигенному фотосинтезу	+	—

1.1. ПРОКАРИОТЫ

Среди прокариот различают бактерии (или эубактерии) и археи (или археобактерии). Основанием для выделения этих групп, рассматриваемых некоторыми исследователями как отдельные царства, послужили результаты сравнения олигонуклеотидных последовательностей 16S рибосомных РНК, а также выявления различий в составах клеточных стенок, липидов и ряда других особенностей. Большинство известных прокариот составляют различные группы бактерий (эубактерий). Известные археобактерии включают метаногенов, отдельных сульфатредукторов, экстремальных галофилов, термоплазм, лишенных клеточной стенки, а также экстремально термофильных бактерий, окисляющих и восстанавливающих молекулярную серу. За последние годы обнаружено значительное число новых представителей архей.

1.1.1. Размеры и форма клеток

Большинство прокариот — одноклеточные формы. Величина клеток многих прокариот находится в пределах 0,2—10,0 мкм. Однако среди них есть «карлики» (примерно 0,1 мкм — трепонемы, микоплазмы) и «гиганты» (длиной до 100 мкм — *Achromatium*, *Macromonas*). Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Это чаще всего палочки разной длины, сферические клетки (кокки), а также извитые формы — вибрионы, спириллы и спирохеты. Обнаружены виды с треугольными, квадратными и плоскими (тарелкообразными) клетками, некоторые имеют отростки-простеки (рис. 1—7).

Тип группирования клеток иногда помогает определить систематическую принадлежность бактерий. Они могут быть одиночными, объединяться в пары, короткие и длинные цепочки правильной (стрептококки) и неправильной (стафилококки) формы, образовывать пакеты из 4, 8 и более клеток (сарцины), формировать розетки и сети. Значительное число бактерий из актиноциетной группы образуют мицелий. Известны также многоклеточные прокариоты, образующие трихомы, прямые и ветвящиеся (рис. 8—13).

1.1.2. Строение клеток

Большинство прокариот имеет ригидную клеточную стенку, под которой расположена цитоплазматическая мембрана. Состав и строение клеточной стенки — важный систематический признак, по которому прокариоты подразделяют на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки. Свообразным строением и составом клеточной стенки характеризуются археи. Грамположительные бактерии отличаются от грамотрицательных большим (до 40 раз) содержанием муреина (пептидогликана) в клеточной стенке и отсутствием внешней мембраны. Археи муреина не синтезируют, но некоторые образуют псевдомуреин.

У многих бактерий на поверхности находят ворсинки (фимбрии, пили), а подвижные формы часто имеют жгутики. На поверхности клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы различной толщины. Они чаще всего полисахаридной, но бывают и гликопротеидной или полипептидной природы.

Прокариоты характеризуются сравнительно простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, хотя многие бактерии имеют включения. Среди них в первую очередь следует отметить различного рода внутриклеточные мембранные пузырьки, образованные в результате инвагинации цитоплазматической мембраны. Развитая сеть внутрицитоплазматических мембран характерна для фототрофных прокариот (хроматофоры, тилакоиды), нитрифицирующих и метанооксилирующих бактерий. Некоторые клетки образуют газовые вакуоли (аэросомы), окруженные



Рис. 1. Сочетания сферических клеток:
1 — диплококки; 2 — стрептококки; 3 — тетракокки
и сарцины; 4 — стафилококки и микрококки



Рис. 2. Палочковидные бактерии:
1 — *Pseudomonas aeruginosa*;
2 — *Bacillus mycoides*; 3 — *Bacillus megaterium*;
4 — *Cytophaga* sp.



Рис. 3. *Azotobacter vinelandii*:
1 — сугочная культура; 2—16-суточная;
3—10-суточная



Рис. 4. Клубеньковые бактерии:
1 — палочки и кокки в молодой культуре; 2 —
бактероиды

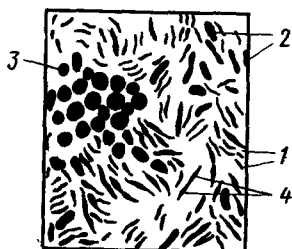


Рис. 5. Миксобактерии:
1 — вегетативные клетки;
2 — формы, переходные к
микроцистам; 3 — микро-
цисты; 4 — делящиеся клет-
ки



Рис. 6. Извитые клетки:
1 — вибрионы; 2 — спириллы; 3 —
спирохеты

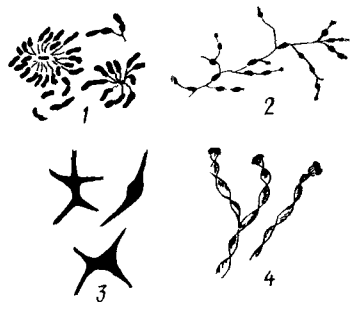


Рис. 7. Бактерии, образующие
выросты:
1 — *Caulobacter*; 2 — *Hypho-*
microbium; 3 — *Ancaelomicro-*
bium; 4 — *Gallionella*

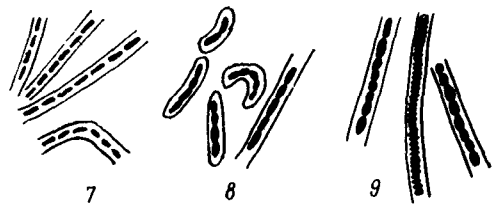
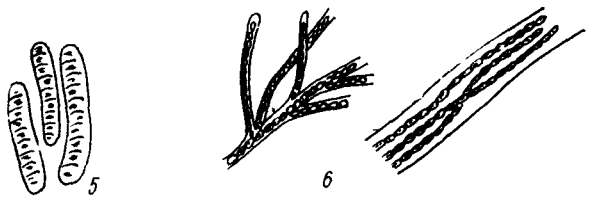
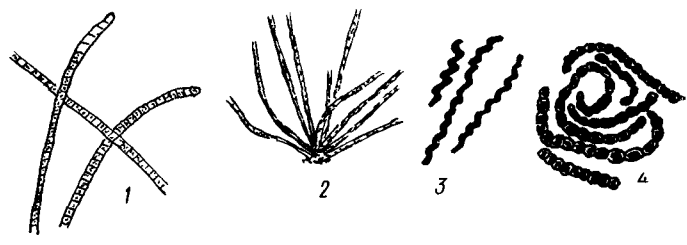


Рис. 8. Нитчатые бактерии:
1 — *Beeggiatoa*; 2 — *Thiiothrix*; 3 — *Saprospira*; 4 — *Simon-*
siella; 5 — *Caryophanon*; 6 — цианобактерии рода *Microco-*
eleus; 7 — *Leptotrix*; 8 — *Sphaerotilus*; 9 — *Crenothrix*

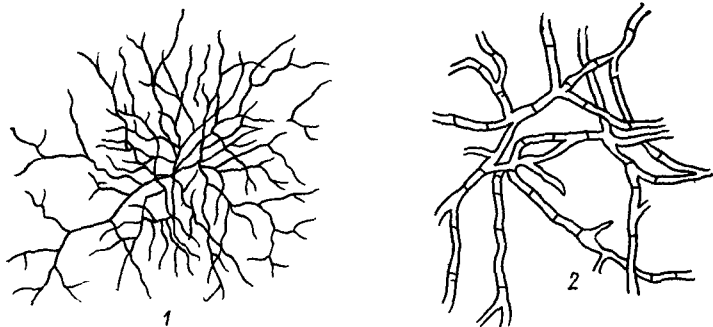


Рис. 9. Мицелий актиномицета (1) и гриба (2) при одинаковом увеличении

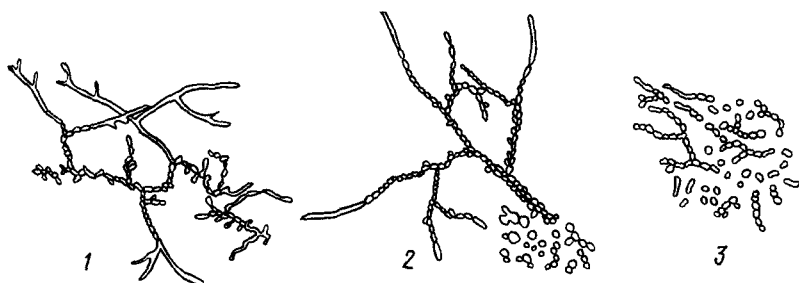


Рис. 10. Нокардии:
1 — 2-суточная культура; 2 — 4—5-суточная; 3 — 7—8-суточная

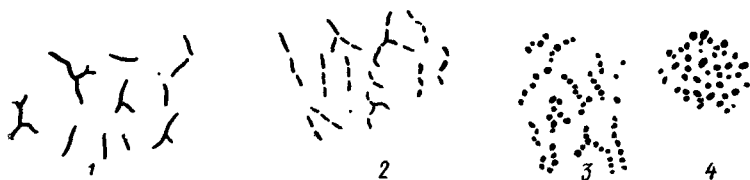


Рис. 11. Микобактерии:
1 — суточная культура; 2 — 2-суточная; 3 — 3—4-суточная; 4 — 10-суточная

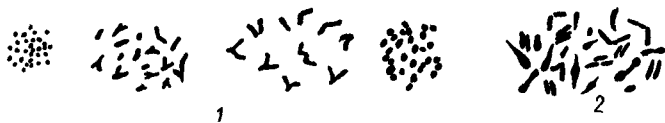


Рис. 12. *Arthrobacter* (1) и *Corynebacterium* (2)

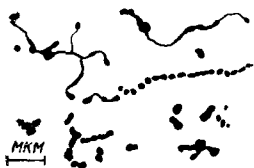


Рис 13 Микоплазмы.
Схема электронной
микрофотографии

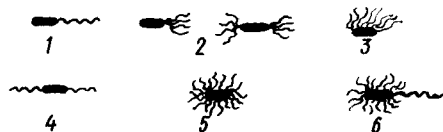


Рис 14. Типы жгутикования у бактерий:
1 — монотрихальное; 2 — лототрихальное; 3 — латеральное; 4 — амфитрихальное; 5 — перитрихальное; 6 — «смешанное» полярно-перитрихальное

белковой мембраной, выполняющие у водных организмов роль регуляторов плавучей плотности. Многие бактерии откладывают внутриклеточно запасные вещества (полисахариды, поли-β-оксипутират, полифосфаты, серу). Отдельные виды спорообразующих бактерий иногда имеют параспоральные тельца белковой природы.

1.1.3. Движение клеток

Среди прокариот есть подвижные и неподвижные виды. Движение клеток чаще всего осуществляется за счет вращения жгутиков (рис. 14). Еще одним способом движения является скольжение клеток, механизм которого изучен недостаточно. Описано «прыгающее» движение, природа которого также не выяснена. Подвижные бактерии способны осуществлять реакции таксиса: аэро- и фототаксис, хемо- и магнитотаксис.

1.1.4. Размножение и развитие прокариот

Большинство бактерий размножаются в результате бинарного деления, реже — почкованием, а некоторые (например, актиномицеты) — с помощью экзоспор или обрывков мицелия (рис. 15—18). Известен также способ множественного деления (у ряда цианобактерий). Многоклеточные прокариоты могут размножаться отделением от трихома нескольких или одной клетки. У ряда бактерий обнаружена конъюгация, однако она не обеспечивает полной передачи генетического материала из одной клетки в другую.

Некоторые прокариоты характеризуются сложным циклом развития, в процессе которого может меняться морфо-

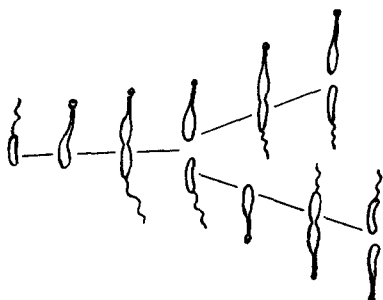


Рис. 15. Схема роста и деления клеток *Caulobacter*

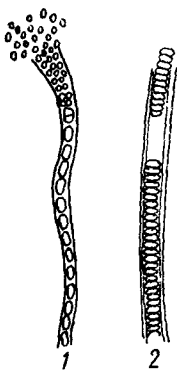


Рис. 16. Гонидии (1) и гормогонии (2) нитчатых бактерий

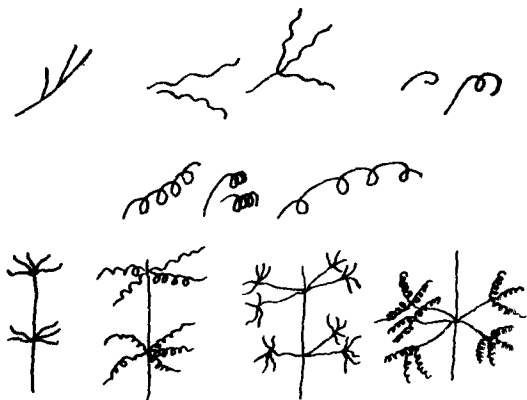


Рис. 17. Формы воздушных спороносцев у актиномицетов

логия клеток и образуются покоящиеся формы: цисты, эндоспоры, акинеты (рис. 19—20). Известны бактерии, образующие плодовые тела, часто причудливых конфигураций и расцветок.

Отличительной особенностью бактерий является их способность к быстрому размножению. «Чемпионами» в этом отношении являются фотобактерии, время генерации которых примерно 8 мин. Для *Escherichia coli* (время удвоения — 20 мин) подсчитано, что потомство одной клетки в случае неограниченного роста бактерий уже через 48 ч могло бы дать биомассу, в 4000 раз превышающую массу Земли.

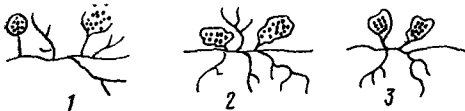


Рис. 18. Спорангии актиномицетов:
1 — *Actinoplanes*; 2 — *Amorphaosporangium*;
3 — *Spirillospora*

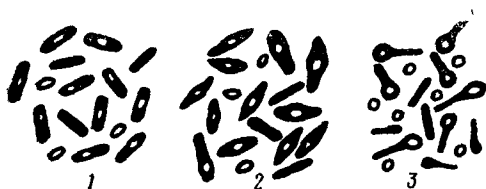


Рис. 19. Типы образования эндоспор у бактерий:
1 — бациллярный; 2 — клостридиальный;
3 — плектридиальный

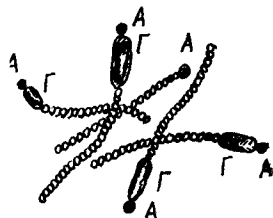


Рис. 20. Акинеты (А) и гетероцисты (Г) нитчатой цианобактерии *Cylindrospermum*

1.2. ЭУКАРИОТЫ

В отличие от прокариот, к эукариотам относятся как микро, так и макроорганизмы. Эукариотные микроорганизмы представлены грибами, рядом групп водорослей и простейшими.

1.2.1. Грибы

Грибы — обширная группа гетеротрофных микроорганизмов, широко распространенных в природе. Большинство из них являются сапрофитами, однако есть и паразитические виды. Грибы подразделяют на два отдела: Еumycota и Oomycota. Характерной особенностью большинства грибов является образование мицелия. Мицелиальные грибы, предмет изучения микробиологов, объединяют представителей в основном трех классов: Zygomycetes, Ascomycetes и Deuteromycetes (все из отдела Еumycota).

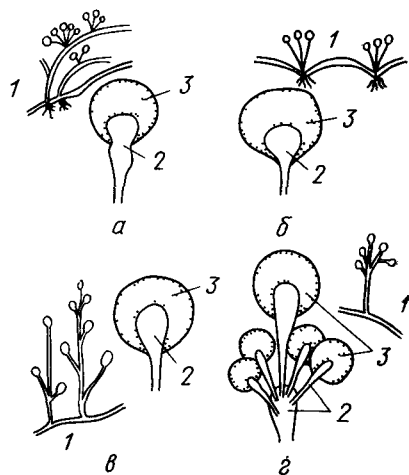


Рис. 21. Спорангии и спорангионосы некоторых зигмицетов *Absidia* (а), *Rhizopus* (б), *Mucor* (в), *Actinomyces* (г); 1 — плодоносящий мицелий; 2 — спорангионосы; 3 — спорангий со спорами

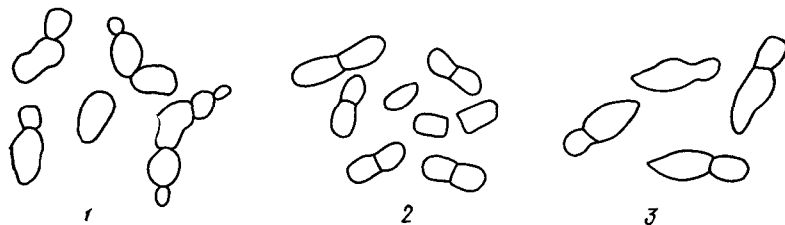


Рис. 22. Способы вегетативного размножения дрожжей: 1 — почкование; 2 — деление; 3 — почкующееся деление

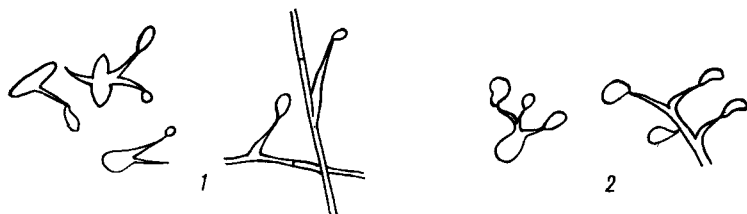


Рис. 23. Баллистоспоры на отдельных клетках и гифах мицелия: 1 — *Sporobolomyces*; 2 — *Sporidiobolus*

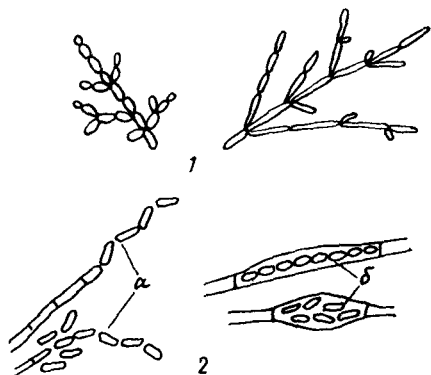


Рис. 24. Мицелиальные формы дрожжей:

1 — псевдомицелий, 2 — истинный мицелий; а — артроспоры, б — зидоспоры

Зигомицеты, имеют не разделенный на отдельные клетки многоядерный мицелий (ценоцитный). Они характеризуются особым типом полового размножения, которое включает стадию образования зигоспоры из двух родительских гиф (рис. 21). К числу зигомицетов относятся муконовые грибы *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Absidia* и ряд других.

Аскомицеты (сумчатые грибы) образуют гифы, которые, в отличие от зигомицетов, разделены поперечными перегородками. Особенностью этих грибов является характерный орган спороношения — аск, в котором формируются аскоспоры. Значительная часть аскомицетов способна

Рис. 25. Жизненные циклы некоторых дрожжей:

1 — *Saccharomyces cerevisiae*; 2 — *Schizosaccharomyces octosporus* (*Octosporomyces octosporus*)

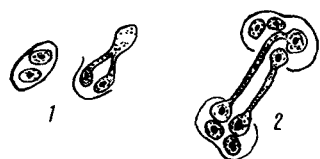
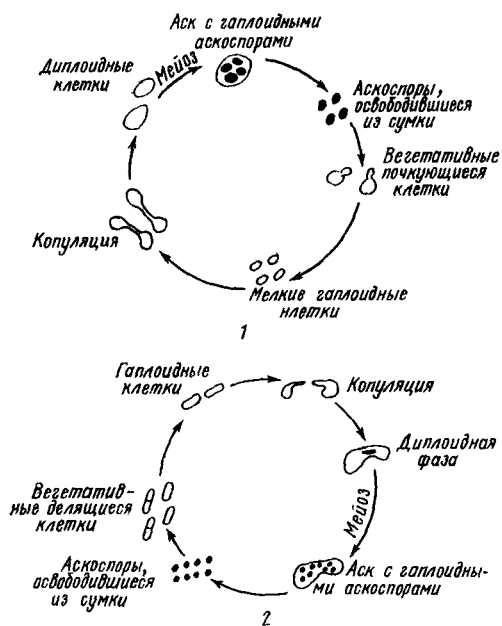


Рис. 26. Копуляция между аскоспорами одной сумки (1) и разных сумок (2)

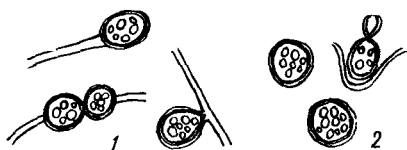


Рис. 27. Хламидоспоры дрожжей: 1 — на гифах мицелия; 2 — без мицелия. В хламидоспорах видны капли жира

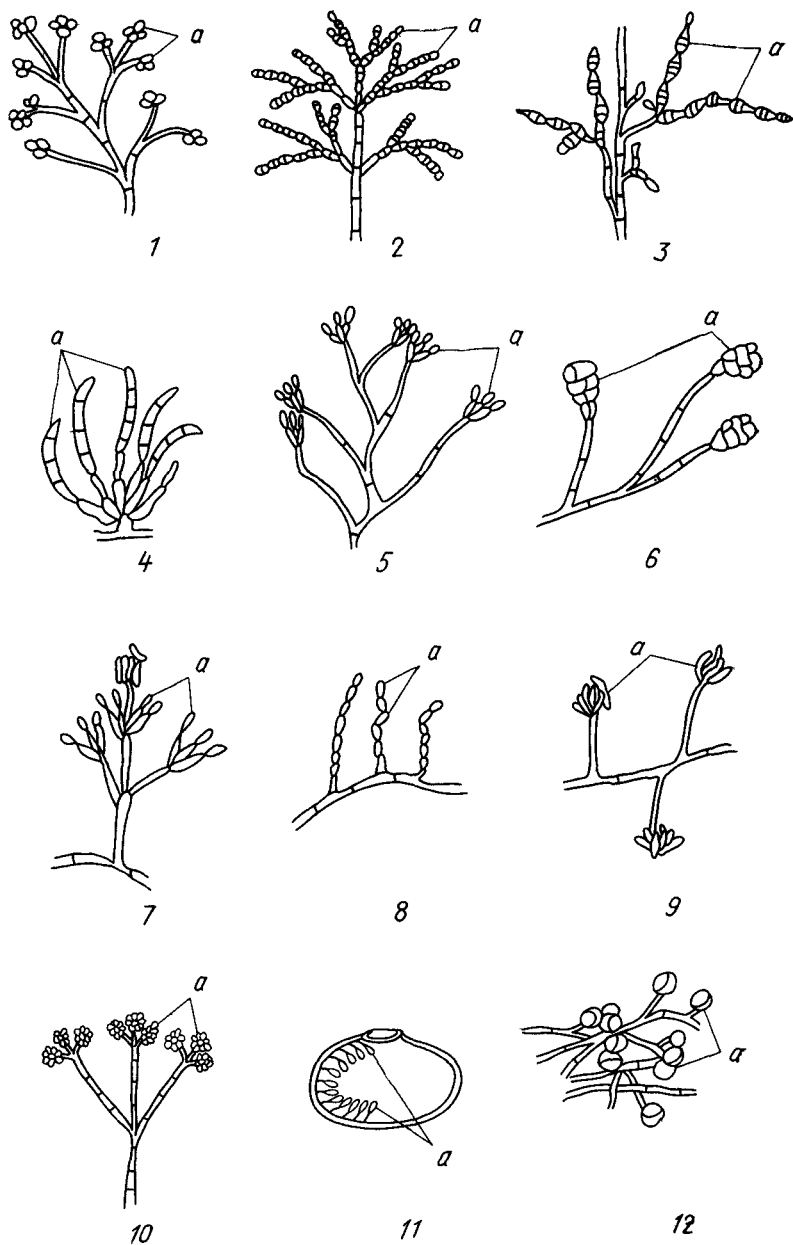


Рис. 28. Конидиеносцы и конидии несовершенных грибов: 1 — *Trichoderma*; 2 — *Cladosporium*; 3 — *Alternaria*; 4 — *Fusarium*; 5 — *Stachybotris*; 6 — *Stemphylium*; 7 — *Verticillium*; 8 — *Oospora*; 9 — *Cephalosporium*; 10 — *Botrytis*; 11 — *Phoma* (пикнида с конидиями); 12 — *Mycogone*; а — конидии

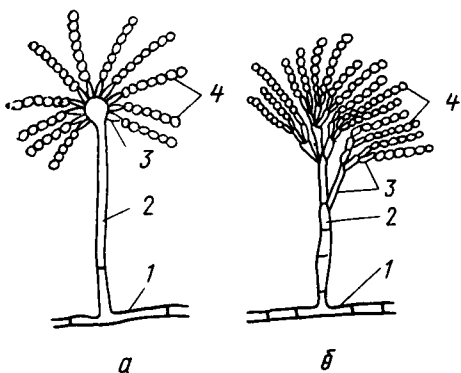


Рис. 29. Конидиеносцы у грибов рода *Aspergillus* (а) и *Penicillium* (б); 1 — вегетативный мицелий; 2 — конидиофор; 3 — стеригмы; 4 — конидии

размножаться неполовым путем с помощью конидий (рис. 22—23, 24). К аскомицетам относятся многие дрожжи, которые существуют в виде отдельных неподвижных клеток и размножаются почкованием или, реже, делением. Аскомицетные дрожжи могут размножаться и половым путем, образуя аски с 2—8 спорами (рис. 25—26). На определенных стадиях развития некоторые дрожжи образуют мицелий или псевдомицелий, на концах которого можно обнаружить споры (рис. 23—24). Отдельные представители дрожжей (*Lipomyces*, *Cryptococcus*)

в качестве покоящейся стадии образуют хламидоспоры (рис. 27). К числу широко используемых в различных микробиологических исследованиях дрожжей относятся представители рода *Saccharomyces*, например *S. cerevisiae*.

Дейтеромицеты (несовершенные грибы) — разнообразная группа микроорганизмов с отсутствующей (или не обнаруженной) половой стадией (рис. 28). Многие несовершенные грибы могут осуществлять парасексуальный процесс, при котором слияние и последующее деление ядер происходят непосредственно в мицелии. К дейтеромицетам относят представителей родов *Penicillium*, *Aspergillus* (рис. 29), некоторые дрожжи (*Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*). Многие дейтеромицеты патогенны для животных и человека.

1.2.2. Водоросли

Водоросли включают фототрофные организмы, среди которых есть макро- и микроформы. Обладая двумя фотосистемами, водоросли осуществляют кислородный фотосинтез. Состав пигментов обуславливает их цвет, который может быть зеленым, бурым, красным, золотистым. Все водоросли образуют каротиноиды и хлорофилл *a*, а некоторые в дополнение к ним, хлорофилл *b* и/или *c*, а также фикобилины. В клетках водорослей могут накапливаться различные запасные вещества — крахмал, парамилон, ламинарин.

Классификация водорослей основана на их морфологии, подвижности, наборе пигментов, природе запасных веществ, составе клеточной стенки. Они подразделены на ряд групп, из которых объектами микробиологов в основном служат представители следующих отделов.

Зеленые водоросли — обитатели пресных и морских вод, почв и стволов деревьев, — представлены одноклеточными и многоклеточными формами, которые размножаются как бесполом, так и половым путем.

Диатомовые водоросли, составляющие основную массу фитопланктона (более 10 тыс. видов), — одноклеточные микроорганизмы, многие из которых заключены в кремниевые панцири различной величины и формы. Панцирь, состоящий из двух створок, напоминает чашку Петри, он раскрывается в процессе бесполого размножения, расходится после деления на две части, каждая из которых достраивает себе недостающие половинки. Диатомеи размножаются и половым путем. Многие представители этой группы обладают билатеральной симметрией и осуществляют скользящее движение за счет выделения слизи из специальных отверстий в створках.

Динофлагелляты — одноклеточные микроорганизмы с 2 боковыми жгутиками. Наряду с диатомеями они составляют существенную часть фитопланктона. Некоторые динофлагелляты образуют токсины, летальные для человека, поэтому в период их массового развития («красное цветение» водоемов) запрещается отлов морских организмов, в мясе которых концентрируется токсин.

Эвгленовые — небольшая группа пресноводных водорослей, лишенная клеточной стенки и имеющая сходство с простейшими. Помимо роста на свету они способны расти в темноте, получая энергию при окислении органических веществ. Некоторые виды эвгленовых передвигаются амебовидным движением, в то время как другие — с помощью жгутиков. Интересной особенностью некоторых видов является наличие светочувствительного органа, стигмы, которая ориентирует клетки на источник света.

1.2.3. Простейшие

Простейшие составляют большую группу одноклеточных гетеротрофных микроорганизмов, широко распространенных в природе. Они лишены клеточной стенки (хотя некоторые имеют панцирь) и поглощают питательные вещества абсорбцией через клеточную мембрану или путем эндоцитоза. Размножение этих микроорганизмов осуществляется половым и бесполом путями, иногда оба способа воспроизводства составляют стадии единого жизненного цикла организма. Простейших, представляющих интерес для микробиологов, находят в 4 классах: амёб, жгутиконосцев, реснитчатых и споровозов. По некоторым классификационным схемам к простейшим относят и слизевиков (*Mucoromycota*), которых раньше включали в число грибов.

Амебы (*Rhizopoda*) обитают преимущественно в воде. Они подвижны благодаря псевдоподиям, которые также способствуют захвату пищи с последующим фагоцитозом. Жизненный цикл амеб относительно прост. Одной из его характерных стадий является фаза инцистирования, образования покоящихся цист из активно питающихся клеток, трофозонтов. Как правило, амебы — свобод-

ноживущие организмы, однако некоторые виды являются паразитами и вызывают различные заболевания человека, например кариес зубов и амебную дизентерию.

Жгутиконосцы (*Mastigophora*) — организмы, включающие и паразитирующие, и свободноживущие формы. Некоторые их представители вызывают тяжелые болезни человека и животных.

Реснитчатые (*Ciliata*) — в основном свободноживущие виды, играющие активную роль в разложении органических загрязнений при очистке воды. Некоторые реснитчатые образуют симбиозы и растут в рубце жвачных животных.

Спорозоа (*Spogozoa*) — класс простейших, образующих споры на определенных стадиях развития. Эти паразитирующие формы простейших имеют сложный жизненный цикл, который включает в себя половую и бесполовую стадии размножения. Среди спорозоа много возбудителей заболеваний человека и животных.

1.3. ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Среди физических факторов, определяющих рост микроорганизмов, следует прежде всего выделить температуру. Оптимальная температура для мезофильных форм составляет 25—40°. Среди обитателей глубин океанов, почв и болот тундры находят психрофилов, которые растут при более низкой температуре (оптимумы роста при 5—15°). Известны экстремальные термофилы, способные расти при 70—110°. Споры отдельных микроорганизмов могут выдерживать кратковременное нагревание до 160—180° и длительное охлаждение до —196° и ниже.

Некоторые виды микроорганизмов хорошо переносят гидростатическое давление до 1000 ати. Выделены облигатные барофилы, которые не способны расти при давлении ниже 500 ати. Но есть виды, не выдерживающие даже незначительного превышения давления над атмосферным.

Отдельные представители микроорганизмов чрезвычайно устойчивы к ионизирующей радиации и способны расти даже в воде охлаждающих контуров атомных реакторов (*Deinococcus radiodurans*, некоторые дрожжи).

Важным фактором, от которого зависит рост микроорганизмов, является осмотическое давление. В то время как большинство организмов не размножаются при концентрации соли (NaCl) в среде более 0,5 М, экстремальные галофилы нуждаются в содержании в среде от 2,5 М и выше до насыщенного раствора NaCl .

Микроорганизмы чувствительны к кислотности окружающей среды. Экстремальные ацидофилы могут расти от рН 0,5—1,0, а алкалофилы — при рН до 10,0—11,0. Однако большинство микроорганизмов растут в средах с рН близким 7,0.

По отношению к молекулярному кислороду микроорганизмы делятся на облигатных аэробов и анаэробов (факультативных, аэротолерантных и строгих). Подавляющая часть известных мик-

роорганизмов являются аэробами, способными расти лишь в присутствии молекулярного кислорода, но некоторых угнетает его обычная концентрация в воздухе, и они могут расти лишь при незначительном его содержании в газовой фазе (до 1,0—5,0%). Последних называют микроаэрофилами. Факультативные анаэробы могут расти как в присутствии молекулярного кислорода, так и в его отсутствие, изменяя свой метаболизм, например с дыхания на брожение (некоторые дрожжи). Рост аэротолерантных анаэробов не угнетается из-за небольшого содержания молекулярного кислорода, однако эти микроорганизмы кислород не используют (например, молочнокислые бактерии). Строгие же анаэробы не выдерживают даже следов молекулярного кислорода в среде, где они растут, он является для них ядом (метаногены, ацетогены, большинство сульфатредукторов, некоторые грибы, а также отдельные виды простейших).

1.4. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Энергетические и конструктивные процессы, осуществляемые микроорганизмами, отличаются большим разнообразием (табл. 2).

В зависимости от соединений углерода, которые используются в конструктивном обмене, микроорганизмы подразделены на автотрофов, осуществляющих синтез углеродсодержащих клеточных компонентов из CO_2 , и гетеротрофов, которые нуждаются для этих целей в готовых органических веществах. Среди гетеротрофов основная часть микроорганизмов представлена сапрофитами (сапротрофами), которые используют органические соединения, образуемые в процессе жизнедеятельности или распада других организмов. Гетеротрофные микроорганизмы включают виды, способные расти при наличии простых органических веществ в среде, и облигатных паразитов (паратрофов), которые полностью зависят от

Таблица 2

Типы энергетического и конструктивного обмена микроорганизмов

Источник энергии	Доноры электронов	Источники углерода	
		органические	углекислота
Свет	органические	фотоорганогетеротрофия	фотоорганоавтотрофия
Свет	неорганические	фотолитогетеротрофия	фотолитоавтотрофия
Органический	органические	хемоорганогетеротрофия	хемоорганоавтотрофия
Неорганический	неорганические	хемолитогетеротрофия	хемолитоавтотрофия

метаболизма хозяина, используя синтезируемые им различные сложные органические вещества.

Широкие возможности микроорганизмы проявляют при утилизации соединений азота. Большинство про- и эукариот использует восстановленные соединения азота (чаще всего соли аммония), некоторые нуждаются в готовых аминокислотах, а другие усваивают и окисленные его формы (прежде всего нитраты). Значительное число прокариот, свободноживущих и симбиотических, обладают способностью фиксировать молекулярный азот. Это свойство отмечено только для прокариот и обнаружено у аэробов и анаэробов.

Фосфор, входящий в состав нуклеиновых кислот и других соединений клетки, извлекается микроорганизмами преимущественно из фосфатов. Источником серы, которая необходима для биосинтеза аминокислот и некоторых кофакторов, чаще всего является сульфат. Лишь некоторые виды микроорганизмов, не способные к ассимиляционной сульфатредукции, нуждаются в восстановленных соединениях серы.

Энергетические процессы, осуществляемые микроорганизмами, включают фотосинтез, брожения, аэробное и анаэробные дыхания. Все они приводят в конечном итоге к запасанию энергии главным образом в АТФ, которая расходуется на различные энергопотребляющие процессы.

Синтез АТФ у микроорганизмов может происходить различными путями. При окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании, которые связаны с мембранами и поэтому объединены под общим названием мембранного фосфорилирования, преобразование энергии происходит вначале в форме трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода или Na^+ , в то время как субстратное фосфорилирование приводит к запасанию энергии непосредственно в макроэргических связях АТФ и других химических соединений.

1.5. МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРИРОДЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Сообщество микроорганизмов в естественных местах обитания является важнейшим фактором, определяющим целостность экологических систем в природе. В особых условиях микроорганизмы могут представлять единственную форму жизни. В процессе эволюции выработались различные типы взаимоотношения между микроорганизмами. Тесная связь между ними (симбиоз) строится на различных характерах зависимости партнеров: взаимовыгода (мутуализм), неблагоприятное влияние на одного из партнеров (паразитизм), реже — индифферентные отношения друг с другом (нейтрализм).

Изучение микробного мира расширяет рамки наших представлений о границах живой природы и свидетельствует об активном участии микроорганизмов в кругообороте веществ на Земле. Используя и образуя метан, поглощая CO и CO_2 , трансформируя

всевозможные органические соединения в разных, в том числе экстремальных, условиях, микроорганизмы активно участвуют в цикле превращения углерода. Фиксируя молекулярный азот, окисляя аммиак и нитриты, осуществляя денитрификацию, микроорганизмы обеспечивают азотный круговорот в природе, а способность окислять восстановленные серосодержащие соединения и восстанавливать окисленные определяет их роль в круговороте серы.

Влияние микроорганизмов не всегда позитивно: некоторые из них вызывают тяжелые заболевания у человека, животных и растений. Нередки случаи, когда микроорганизмы приводят к порче сельскохозяйственной продукции, разрушению подземных частей зданий, трубопроводов и металлических конструкций шахт. Изучение свойств таких микроорганизмов позволяет разработать эффективные способы защиты от вызываемых ими повреждений. С другой стороны, положительное значение микроорганизмов для практики невозможно переоценить. С помощью грибов и бактерий готовят хлеб, вино, пиво, квас, молочнокислые продукты, закваски. При участии микробов получают ацетон и бутанол, уксус, лимонную кислоту, некоторые витамины, ряд ферментов, антибиотики и каротиноиды. Микробы участвуют в трансформации стероидных гормонов и других соединений. Их используют для получения белка и ряда аминокислот. Реализуется идея использования микробных ферментов в диагностических целях. Применение микробных комплексов для превращения сельскохозяйственных отходов в биогаз (смесь метана и углекислоты) или этанол открывает возможность создания принципиально новых систем восполнения энергетических ресурсов. В последние годы микроорганизмы, особенно прокариоты, широко применяют в качестве объектов генной инженерии для клонирования генов и создания векторов.

Потенциал микроорганизмов в практическом отношении неисчерпаем. Углубление знаний о жизнедеятельности этих микроскопических, но макрозначимых существ открывает новые направления их эффективного использования в биотехнологии.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

Микробиологи имеют дело с популяциями (культурами) микроорганизмов, состоящими из миллионов особей. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют чистой. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название смешанной. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Ввиду того что в воздухе и на поверхности предметов (на столах, инструментах, одежде), а также на руках, волосах и т. д. всегда имеется большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Требование чистоты культур в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Под лабораторные комнаты отводят наиболее светлые, просторные помещения, естественное освещение которых должно составлять не менее 110 лк. Поверхность столов и пол всех лабораторных помещений покрывают легко моющимся материалом — пластиком или линолеумом, а стены на высоту 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской. Основное рабочее помещение оборудовано столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения аппаратуры, посуды и реактивов. Столы имеют подводку электроэнергии и снабжены газовыми горелками.

Кроме основного рабочего помещения лаборатория имеет стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, бокс, моечную, холодильную комнату, термостаты или термостатированные комнаты для выращивания микроорганизмов, помещение для хранения культур и т. д. Бокс служит для пересевов микроорганизмов и представляет собой небольшую изолированную комнату, разделенную перегородкой на две части. Входят в рабочее помещение бокса через тамбур с раздвижной дверью, что исключает резкое перемещение воздуха и, следовательно, занесение извне посторонних микроорганизмов. Оборудование бокса состоит из стола, стула, газовой горелки и бактерицидной лампы, укрепленной в специальном штативе или смонтированной на потолке бокса. Удобно иметь в боксе подсобный стол, на котором размещают необходимые во время работы предметы.

Широко используют настольные боксы разных конструкций — от камер с полностью открытой передней панелью до герметически закрытых камер, работа в которых осуществляется под отрицательным воздушным давлением с помощью прикрепленных к передней панели резиновых перчаток. В некоторых боксах («ламинарах») чистота атмосферы рабочего пространства обеспечивается циркуляцией стерильного воздушного потока внутри камеры.

2.1. ПОДГОТОВКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ К РАБОТЕ

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. В ней не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Для этого применяют различные способы дезинфекции. Слово «дезинфекция» означает обеззараживание, т. е. уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды. Однако при дезинфекционной обработке погибают не только патогенные, но и сапрофитные бактерии. Иногда процесс дезинфекции оказывает стерилизующее действие.

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории обрабатывают пылесосом и протирают растворами различных дезинфицирующих веществ. Обработка пылесосом обеспечивает освобождение предметов от пыли и удаление с них значительного количества микроорганизмов. Установлено, что при 4-кратном проведении щеткой пылесоса по поверхности предмета с него удаляется примерно 47% микроорганизмов, а при 12-кратном — до 97%. В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего пользуются 2—3%-ным раствором соды (бикарбоната натрия), 3—5%-ным раствором фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5—3%-ным водным раствором хлорамина и некоторыми другими дезинфектантами.

Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30—60 мин) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха — облучение ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызвать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов.

Воздействие ультрафиолетовых лучей должно быть непосредственным и длительным. Это связано прежде всего с тем, что ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способ-

ностью. Они не проходят, например, через обычное стекло, легко поглощаются частицами пыли. Кроме того, некоторые предметы, такие как белая бумага, пластины из полированного алюминия или хрома, могут заметно отражать ультрафиолетовые лучи. Поэтому в зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов.

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются бактерицидные лампы. Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления. Более 80% испускаемого ими спектра приходится на волны длиной 254 нм. Обычно бактерицидные лампы представляют собой трубки различного диаметра и длины, изготовленные из специального стекла, пропускающего излучение с длиной волны 254 нм. Каждая трубка вмонтирована в корпус-держатель и может быть снабжена отражателем. Необходимо иметь в виду, что ультрафиолетовые лучи могут вызвать тяжелые поражения глаз. Поэтому при работе с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя. Следует также учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается. В этих случаях облучение целесообразно вести с перерывами.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70%-ные (по объему) растворы изопропилового или этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. Поверхность рабочего стола можно дезинфицировать и ультрафиолетовыми лучами. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

В лаборатории не разрешается курить, хранить и употреблять еду, напитки, жевательную резинку. Работать следует в халатах.

2.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и в жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрацы и чашки Петри (рис. 30). Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Способы приготовления питательных сред и стерилизации подробно описаны ниже (см. главы 3—4).

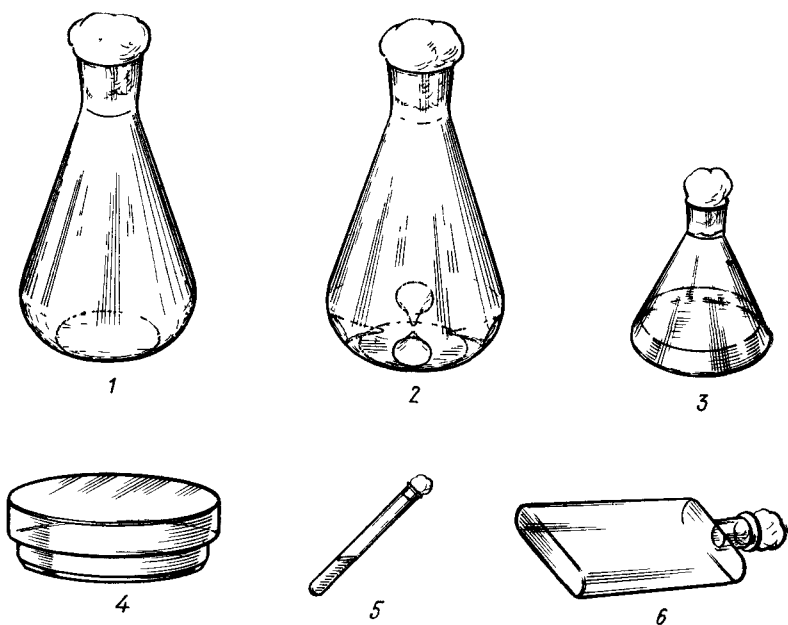


Рис. 30. Посуда для культивирования микроорганизмов
 1 — качалочная колба; 2 — качалочная колба с отбойниками; 3 — коническая колба; 4 — чашка Петри, 5 — пробирка, 6 — матрац

Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется посевом, или инокуляцией. Посев микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Перед посевом следует тщательно надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают чернилами по стеклу или на наклеенной этикетке.

Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей или иглой (рис. 31), если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, когда нужно приготовить препарат или пересеять культуры микроорганизмов, выросшие в жидкой питательной среде, лучше пользоваться не петлей, а стерильной пипеткой. Бактериологические петли и иглы делают, используя тонкую проволоку из вольфрама или никрома, которую закрепляют в металлическом или стеклянном держателе. Диаметр бактериологической петли — 4—5 мм.

Бактериологическую петлю (иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которую будут вводить внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени горелки почти вертикально, чтобы проволока бы-

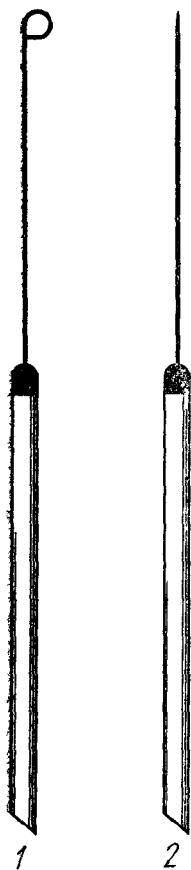


Рис 31 Бактериологическая петля (1) и бактериологическая игла (2)

ла равномерно раскалена на всем протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени (рис. 32), поэтому не следует опускать петлю непосредственно к горелке. Сразу же после стерилизации петлю (иглу) вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю (иглу) вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом. Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю так, как держат карандаш, и прокалывают в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так во время последующих манипуляций. Края открытой пробирки с культурой микроорганизмов обжигают в пламени горелки и после этого вводят в пробирку стерильную петлю. Взяв небольшое количество микробной массы с поверхности субстрата, вынимают петлю из пробирки, следя за тем, чтобы переносимый материал не касался стенок или краев пробирки. Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем

обжигают ватную пробку и закрывают ею пробирку. Если конец ватной пробки загорится, то не следует бросать пробку. Ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет. Ни в коем случае нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это только усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует снова вставлять ее в пробирку. Нужно взять новую стерильную пробку и начать всю операцию заново. Закрытую ватной пробкой пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата или для пересева культуры в свежую среду.

Если культуру пересевают на скошенную агаризованную среду, то петлю вводят в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, проводят снизу вверх либо зигзагообразную, либо прямую черту-штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды. В случае посева в жидкую среду (в колбы или пробирки) петлю с микробной массой погружают непосредственно в среду. Оставшиеся на петле после посева или приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени горелки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокалывают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокалывания петлю можно положить на место.

Из жидкой среды клетки берут следующим образом: пипетку за верхний конец вынимают из бумаги или пенала, в которых ее стерилизовали, и вводят в пробирку или колбу с культурой, соблюдая все правила предосторожности, описанные выше. Отбирать жидкую культуру пипеткой можно с помощью резиновой груши. Исползованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 2—5%-ный водный раствор фенола или 2%-ный раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

Когда необходимо провести рассев микроорганизмов из жидкой питательной среды на поверхность плотной среды в чашке Петри, поступают следующим образом. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. Для этого сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и средним пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (20—30 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды наносят каплю или

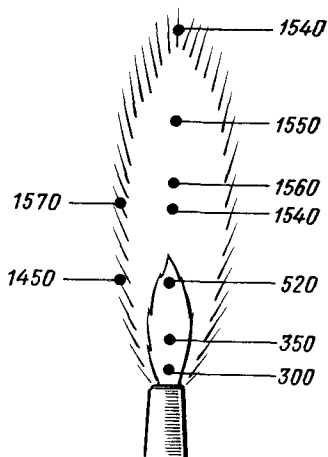


Рис 32 Значение температуры (в градусах Цельсия) в разных участках пламени газовой горелки

«петлю» жидкой культуры, которую осторожно распределяют стек- ляннным стерильным шпателем (шпатель Дригальского) либо пет- лей.

Все описанные манипуляции следует проводить около пламе- ни горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не реко- мендуется делать резкие движения и ходить около лица, рабо- тающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличи- вает вероятность случайного ее загрязнения. После посева про- бирку или другие сосуды, в которых выращивают микроорганизмы, помещают в термостаты, где с помощью терморегуляторов под- держивается постоянная температура (см. гл. 4). Посуду с куль- турами микроорганизмов, подлежащими выбрасыванию, следует автоклавировать, чтобы убить клетки, и только после этого мыть. Культуры на плотных питательных средах можно заливать на сутки дезинфицирующим раствором, после чего их выбрасывают и посуду моют. Неаккуратное обращение с культурами микроорга- низмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

ВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАПИСЕЙ

Журнал лабораторных работ является документом, позволяю- щим контролировать правильность полученных результатов. В нем должны быть записаны сведения, имеющие отношение к выпол- нению данной работы. Запись необходимо вести аккуратно, четко и в определенном порядке, например:

1. Название опыта и его цель, дата его постановки и окончания.
2. Объект исследования.
3. Условия проведения опыта.
4. Основной принцип используемого метода анализа.
5. Полученные результаты.

Цифровой материал приводят в таблицах. Если необходимо, де- лают графики, диаграммы, рисунки. Каждая лабораторная рабо- та должна заканчиваться собственными наблюдениями и вывода- ми, записанными в журнале.

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация является одним из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание. В практической работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, различные инструменты и другие необходимые предметы с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах. Термин «стерильность» имеет абсолютное значение. Можно говорить только либо о стерильности, либо о нестерильности, но не может быть состояния «частичной» или «неполной стерильности», «близкого к стерильному», «почти стерильного».

Различают термическую и холодную стерилизацию. В микробиологии находят применение следующие способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. Из методов холодной стерилизации микробиологи используют стерилизацию фильтрованием, газообразными средствами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений.

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяются в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

3.1. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

3.1.1. Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование)

Это наиболее надежный и чаще всего применяемый способ стерилизации питательных сред. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Известно, что температура пара возрастает при повышении его давления (табл. 3).

Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает особую эффективность данного способа. При этом погибают

Таблица 3

Температура насыщенного пара
при разных давлениях

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

и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121°. Лишь споры некоторых почвенных микробов погибают при 1 атм только через 30 мин. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах — автоклавах.

Устройство автоклавов.

Автоклавы разнообразны по форме, размерам, рабочему давлению, конструкции и другим показателям; они могут быть с ручным управлением, полуавтоматические и автоматические. Но поскольку все автоклавы предназначены для выполнения одной и той же задачи — стерилизации, основной принцип их устройства один и тот же. Разберем его на примере вертикального автоклава с ручным управлением (рис. 33).

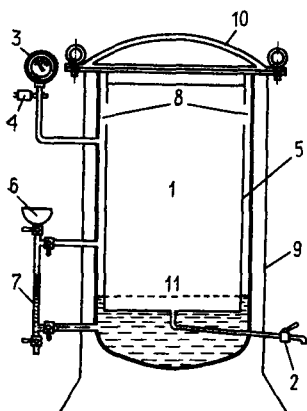


Рис. 33. Схема автоклава: 1 — стерилизационная камера; 2 — кран для выхода воздуха; 3 — манометр; 4 — предохранительный клапан; 5 — водопаровая камера; 6 — воронка для заполнения автоклава водой; 7 — водомерная трубка; 8 — отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 9 — защитный кожух; 10 — крышка автоклава; 11 — подставка для размещения стерилизуемых предметов

Автоклав представляет собой металлический двухстенный резервуар, способный выдерживать высокое давление. Его внутренняя часть является стерилизационной камерой (1). В нее помещают стерилизуемый материал. Стерилизационная камера снабжена краном (2) для выхода воздуха, манометром (3) для определения давления пара и предохранительным клапаном (4) для выхода пара при повышении давления сверх необходимого и для предотвращения разрыва автоклава. Пространство между стенками (5), называемое водопаровой камерой, заполняется через воронку (6) водой (лучше дистиллированной, чтобы не образовывалась накиль) до определенного уровня, который отмечен

на специальной водомерной трубке автоклава (7). Выше этого уровня воду наливать не следует, так как при бурном кипении вода может попасть в трубку, ведущую к манометру, и исказить его показания. В верхней части внутренней стенки водопаровой

камеры имеются отверстия (8), через которые пар поступает в стерилизационную камеру. Паровой котел сверху покрыт защитным кожухом (9). Он предохраняет котел от механических повреждений, а работающих около автоклава — от ожогов. Для создания герметичности автоклав плотно закрывается массивной крышкой (10) с резиновой прокладкой. Стерилизуемые предметы помещают на специальную подставку (11).

Автоклавирование. Отдельные операции процесса стерилизации в автоклавах разных типов могут быть несколько различными. Соответственно немного различается и техника работы с ними. Однако общий принцип проведения стерилизации в разных автоклавах один и тот же.

Перед работой осматривают автоклав и контрольно-измерительную аппаратуру. При наличии любой неисправности (смещение стрелки манометра с нуля, трещина на водомерной трубке и др.) работать с автоклавом нельзя. После осмотра автоклава в водопаровую камеру наливают воду до верхней отметки на водомерной трубке. В некоторых автоклавах предельный уровень заполнения водой контролируется воронкой. В стерилизационную камеру на специальную подставку помещают стерилизуемый материал. Предметы следует размещать не слишком плотно, так как пар должен свободно проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. Загрузив стерилизационную камеру, устанавливают и плотно заворачивают крышку (дверь) автоклава. Затем открывают кран, соединяющий стерилизационную камеру с наружным воздухом, и включают нагрев.

После начала парообразования удаляют воздух из стерилизационной камеры. Это необходимое условие стерилизации, так как при одном и том же давлении температура чистого пара выше температуры смеси пара и воздуха. Поэтому если в автоклаве останется воздух, материал может не простерилизоваться. Наиболее простой и очень распространенный способ освобождения автоклава от воздуха — вытеснение воздуха паром. Пар и конденсат отводят либо в сосуд с водой, либо в специальное устройство, соединенное с канализацией. В первом случае на кран (2) надевают резиновый шланг, который опускают в воду. Началом продувания считают появление устойчивой непрерывной струи чистого пара. Пока в автоклаве еще имеется воздух, смесь воздуха и пара, проходя через воду, издает сильный треск. Чистый пар выходит с равномерным шипящим звуком. Его пропускают в течение 10 мин. В целом вся операция с момента появления пара с воздухом должна занимать не более 15—20 мин, иначе в автоклаве останется мало воды и он может испортиться. Чтобы уменьшить расходы пара (воды), кран открывают не полностью. Степень открывания крана устанавливают на практике при эксплуатации автоклава. В наиболее совершенных автоклавах воздух из стерилизационной камеры удаляют с помощью вакуумного насоса.

Когда воздух вытеснен, закрывают пароотводный кран, и давление пара доводят до показания, соответствующего режиму стерилизации. Режим автоклавирования часто выражают в единицах избыточного давления, указывая при этом продолжительность его поддержания. Например: стерилизация при 1 ати в течение 20 мин. На манометре автоклава обозначается именно то дополнительное давление, которое создается в автоклаве сверх нормального. Нередко режим автоклавирования характеризуют температурой и временем. Как только стрелка манометра дойдет до указателя определенного дополнительного давления и, следовательно, температура пара достигнет соответствующего значения, поддерживают давление на этом уровне необходимое время путем ручного или автоматического регулирования подачи пара. В автоклавах с огневым обогревом подачу пара регулируют интенсивностью горения, в автоматических автоклавах — электроконтактным манометром.

По окончании времени стерилизации выключают нагрев автоклава. Давление в автоклаве постепенно падает и сравнивается с атмосферным. Лишь после этого открывают кран, выводящий пар. Преждевременное открывание крана недопустимо, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала. Когда пар выйдет, открывают крышку (дверь) автоклава, соблюдая при этом осторожность во избежание ожога паром лица и рук. Удаление пара из стерилизационной камеры автоклавов, оснащенных вакуумным насосом, осуществляют с помощью насоса. Одновременно происходит подсушивание стерильного материала.

Поскольку автоклав является аппаратом, работающим при высоких давлениях и температурах, неправильное обращение с ним может быть причиной несчастных случаев. Установка автоклава и работа с ним производятся при строгом и точном выполнении правил, указанных в прилагаемой к аппарату инструкции. К работе допускаются только подготовленные лица.

При необходимости проконтролировать температуру в автоклаве пользуются различными веществами, плавящимися при определенной температуре. Эти вещества предварительно смешивают с нейтральными красителями и помещают в автоклав до начала стерилизации. В качестве индикаторов температуры используют фенантрен (температура плавления 98—100°), бензаурин (115°), серу (119°), бензойную кислоту (121—122°), мочевины (132°), глюкозу (146°), тиомочевину (180°), аскорбиновую кислоту (187—192°). На 100 г этих веществ берут 0,01 г красителя (фуксин, метиленовый синий), тщательно смешивают, рассыпают в стеклянные трубочки с одинаковым диаметром и толщиной стенок, запаивают и в вертикальном положении раскладывают между стерилизуемым материалом в автоклаве. По достижении в сосуде соответствующей температуры эти вещества расплавляются и окрашиваются в цвет добавленного в них красителя.

Подготовка сред к стерилизации. При автоклавировании 3—5% жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию.

Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками. Они предохраняют среду от заражения микроорганизмами, находящимися в окружающем воздухе. Пробки должны быть достаточно плотными, чтобы выполнить эту функцию, но с равномерным распределением волокон ваты, так как через них происходит газообмен культуры с окружающей средой. Слишком плотные пробки затрудняют снабжение культур воздухом.

Для приготовления пробки плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатывают валиком. Чтобы придать пробке прочность, ее прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Длина пробки для обычной пробирки примерно 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5—2,0 см (рис. 34). Для сохранения формы пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Удобно обернуть пробку чистой марлевой салфеткой.

Перед стерилизацией пробки можно прикрыть бумажными колпачками. Нельзя обертывать пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, целлофаном, фольгой или другими материалами, не пропускающими пар, так как пар должен обязательно проникать через пробку в сосуд, иначе среды не нагреются до нужной температуры и не простерилизуются. При использовании стеклянных, резиновых, корковых и других пробок их заворачивают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой. Пробки в сосуде меняют стерильно около пламени горелки.

Выбор режима автоклавирования. В микробиологической практике стерилизацию в автоклавах осуществляют при температуре в пределах 111—138°, т. е. 0,5 до 2,5 ати. Температура ниже 111° не может считаться надежной; температура выше 138°, как правило, не является необходимой, к тому же, чем выше давление пара, тем сложнее условия эксплуатации автоклава. При использовании автоклавов без вакуумных насосов наиболее надежными считаются следующие режимы стерилизации: 15—45 мин при 121° (1 ати) и 10—30 мин при 128° (1,5 ати). Микробиологи чаще всего стерилизуют среды при 0,5 и 1 ати.

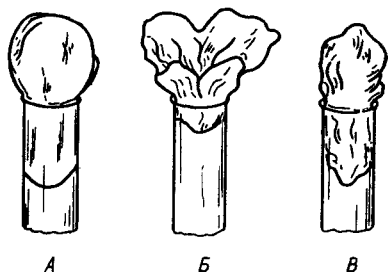


Рис. 34. Ватные пробки:
А — приготовлена правильно; Б и В — приготовлены неправильно

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются прежде всего их составом, термоустойчивостью или термолабильностью компонентов. Такие легко разрушающиеся субстраты, как молоко или желатиновые среды, а также субстраты, содержащие сахара, витамины (пивное сусло, соки, дрожжевой автолизат и др.) обычно стерилизуют при 0,5 ати в течение 15—30 мин. Мясопептонные среды можно стерилизовать при 1,0 ати 20 мин. Среды, содержащие агар, стерилизуются труднее, потому что стерилизация начинается фактически после того, как агар расплавится. Но и расплавленный агар требует для стерилизации вдвое больше времени, чем тот же объем воды. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например, тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поскольку они плохо передают тепло и очень медленно прогреваются. Их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при 160° в течение 2 ч или 1 ч при 170°. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см.

Имеются субстраты, в которых могут быть споры, отличающиеся особой термостабильностью. К ним относится почва, причем она, кроме того, и нагревается с замедленной скоростью. Ее обычно стерилизуют при 1 ати, либо один раз 2 ч, либо два дня подряд по 1 ч, а иногда — при 2 ати 2 ч.

Выбирая режим стерилизации, необходимо учитывать рН среды. При кислой реакции многие вещества, входящие в ее состав, могут подвергнуться гидролизу. Чем ниже значение рН, чем выше температура и продолжительнее время стерилизации, тем интенсивнее происходит гидролиз. В результате после стерилизации перестают застывать среды с желатиной и даже с агаром. Если реакция среды щелочная, то при стерилизации выпадают в осадок соли железа, карамелизуются и становятся непригодными для использования бактериями сахара. В некоторых случаях в процессе стерилизации изменяется рН среды. Так, если рН среды с углеводами выше 7,0, то может произойти ее подкисление до рН 6,0. Особенно часто это наблюдается в присутствии ксилозы. Чтобы избежать таких явлений, рекомендуется углеводы, фосфаты, соли железа автоклавировать отдельно в виде более или менее концентрированных растворов в дистиллированной воде при том значении рН, которое обеспечивает целостность вещества. После стерилизации растворы стерильно объединяют в нужном соотношении. Таким приемом отдельной стерилизации в микробиологии пользуются довольно часто, поскольку многие компоненты сред нельзя стерилизовать одним и тем же способом.

Режим автоклавирования в значительной степени зависит от объема стерилизуемого субстрата. Чем больше объем, тем больше времени при одной и той же температуре (давлении) требуется для обеспечения надежности стерилизации. Имеет значение толщина стенок и форма емкостей (табл. 4). Это нужно учитывать в практической работе. Например, не следует стерилизовать термочувствительный субстрат одновременно в пробирках и больших

Зависимость продолжительности стерилизации жидкостей от объема сосудов

Емкость	Объем		Время стерилизации при 121—123°, мин
	мм	мл	
Пробирки	18×150		12—14
	32×200		13—17
	38×200		15—20
Колбы тонкостенные		50	12—14
		125	12—14
		200	12—15
		500	17—22
		900	19—24
		1000	20—25
		1800	25—30
	2000	30—35	
Колбы толстостенные		500	24—28
		1000	25—30
		2000	40—45
Матрацы		1000	30—35
Бутылки		9000	50—55
		100	13—17

3.1.2. Дробная стерилизация (тиндализация) и пастеризация

Тиндализация, или дробная стерилизация, была предложена в 1877 г. Тиндалем. Она применяется для сред, портящихся под действием температур выше 100°. Тиндализацию осуществляют текучим паром в автоклаве с незавинченной крышкой или в кипятильнике Коха. Среды прогревают несколько раз по 10—15 мин. Между прогреваниями среды ставят в термостат при температуре 30° на 8—12 ч для прорастания жизнеспособных спор. Среды, не выдерживающие нагревания при 100°, прогревают более осторожно при 60—80° через каждые 8—12 ч 4—5 дней подряд.

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100° известен под названием пастеризация. Этот метод, предложенный Пастером, предназначен для уничтожения только бесспорных форм микроорганизмов. Следовательно, в подавляющем большинстве случаев он не обеспечивает стерильности. Пастеризацию проводят при 60—80° 10—30 мин. Пастеризацию используют в пищевой промышленности для обработки молока, фруктовых соков, вина, пива и др.

3.1.3. Стерилизация фильтрованием

Фильтрованием стерилизуют синтетические среды строго определенного состава, которые содержат легкоразрушающиеся или

летучие компоненты — витамины, аминокислоты (цистеин и цистин), белки, ароматические углеводороды, антибиотики и др. Фильтрация жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и т. д.

Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,7 мкм. В практике же пригодность фильтров для стерилизации устанавливают путем пробной фильтрации через них суспензии какого-либо мелкого микроорганизма, например *Serratia marcescens*. Для проверки на стерильность фильтр в большом количестве высевают на питательную среду. Если в течение 5 суток тест-организм не вырастет, фильтры могут быть использованы для стерилизации.

Наиболее широкое распространение в микробиологической практике получили мембранные фильтры. Это диски разного размера, диаметра, напоминающие бумажные. Их готовят на основе нитроцеллюлозы. Мембранные фильтры в зависимости от величины пор применяются для фильтрации и стерилизации. Для стерилизации используют отечественные фильтры N 1—4, фильтры N 5—10 фирмы «СИНПОР» и марок VF, VM, VC, SLGS, SLHA, DA фирмы «МИЛЛИПОР».

Плотные диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой, называются фильтрами Зейтца. В зависимости от диаметра пор они обозначаются разными индексами: ЕК — поры диаметром 1,5—1,8; ЕКС — 1,2—1,5; ЕКС-1 — 1,0—1,2; ЕКП — 0,8—1,0 мкм. В России выпускают асбестовые фильтры марок Ф₂ и СФ. Стерилизующими являются СФ-3 и СФ-4.

Асбестовую пластинку помещают в специальный держатель, который обычно изготавливают из нержавеющей стали, и крепко зажимают винтами между верхней (цилиндрической) и нижней (воронкообразной) частями держателя. Трубка нижней части держателя через резиновую пробку проходит в колбу Бунзена. Нередко весь этот прибор в собранном виде называют фильтром Зейтца.

Для стерилизации используют также стеклянные пористые фильтры, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка — «свечи» Шамберлана и из инфузорной земли — «свечи» Беркефельда. Пористость первых обозначается буквой L с цифрами от 1 до 13 соответственно уменьшению диаметра пор

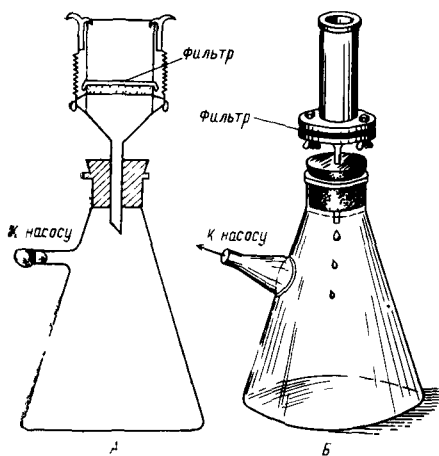


Рис. 35. Приборы для стерилизации фильтрованием:

А — со стеклянным держателем; Б — с металлическим держателем

фильтра от 9 до 1,2 мкм. Мелкопористые свечи обозначаются также маркой «В», крупнопористые — «F». Фильтры Беркефельда обозначают буквами V, N, W, что соответствует следующим размерам пор (мкм): 8—12, 5—7, 3—4.

«Свечи» и специальные держатели с закрепленными в них асбестовыми фильтрами герметически соединяют с колбой Бунзена для фильтрации в вакууме (рис. 35). Перед употреблением фильтры, их держатели и приемник фильтрата должны быть простерилизованы.

Мембранные фильтры стерилизуют автоклавированием при 1 ати 15 мин или длительным кипячением. Держатель вместе с резиновой пробкой заворачивают в бумагу и автоклавируют при 1 ати 20—30 мин. Фильтры Зейтца автоклавируют в собранном виде. «Свечи» стерилизуют вместе с резиновыми пробками в автоклаве. Колбу Бунзена закрывают ватной пробкой, в отводную трубку вставляют ватный тампон и стерилизуют горячим воздухом.

3.2. СТЕРИЛИЗАЦИЯ СТЕКЛЯННОЙ ПОСУДЫ

Основным способом стерилизации стеклянной посуды является обработка ее сухим горячим воздухом при температуре не выше 180° в течение 1—3 ч (табл. 5). При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Стерилизацию осуществляют в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации. Они различаются по форме и способам обогрева, но имеют сходное устройство. Их делают из термостойких материалов — обычно из металла и асбеста. Внутри стерилизатора имеются полки для размещения посуды, а наверху отверстие, в котором с помощью пробки укрепляют термометр. У стенки стерилизатора (шкафа) или вблизи греющей поверхности температура всегда значительно выше, чем внутри, поэтому ртутный шарик термометра должен находиться внутри шкафа на расстоянии 6—8 см от верхней стенки. В верхней части сушильных шкафов имеется также отверстие для вентиляции, которое при стерилизации закрывают. Стерилизаторы и шкафы с электрическим обогревом снабжены терморегулятором, обеспечивающим автоматическое поддержание необходимой температуры.

Таблица 5

Время, необходимое для стерилизации стеклянной посуды сухим жаром

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

Подготовка посуды к стерилизации. Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогревания. Посуду разворачи-

ют непосредственно перед употреблением. В верхние концы пипеток вставляют ватные тампоны. Торчащие из пипеток волокна ваты сжигают в пламени горелки. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4—5 см. Обмотку начинают с оттянутого конца и постепенным движением бумаги по спирали заканчивают у конца с ватным тампоном. Завернутые пипетки для предохранения бумаги от загрязнения и разрывов перед стерилизацией упаковывают по нескольку штук вместе или помещают в специальные металлические или картонные пеналы. Чашки Петри обычно заворачивают в пакеты по 2—4 штуки, шпатели — обязательно по отдельности, но затем, как и пипетки, их объединяют в общий сверток. Колбы, пробирки и трубки Бурри закрывают ватными пробками. На пробки можно надеть бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли.

Стерилизация. Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в стерилизатор (или в сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный, надежный прогрев стерилизуемого материала. Стерилизатор (сушильный шкаф) во время работы должен быть плотно закрыт. При отсутствии терморегулятора, необходимо строго следить за температурой, так как при понижении ее не осуществится стерилизация, а при нагреве выше 180° бумага и пробки начинают обугливаться. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°, так как при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться. Лучше всего выгружать посуду только после того, как температура в стерилизаторе сравняется с комнатной.

Посуду можно стерилизовать и в автоклаве. Режим стерилизации в этом случае существенно зависит от объема сосудов и толщины стекла (см. табл. 4). Для автоклавирования посуду готовят, как и для сухожаровой стерилизации. Следует иметь в виду, что в автоклаве посуда увлажняется.

3.3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ИНСТРУМЕНТОВ И ПРИБОРОВ

Мелкие металлические инструменты: петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели стерилизуют прокаливанием в пламени (т. е. нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при пересевах культур и разливе сред. В пламени погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Шприцы лучше всего стерилизовать сухим жаром при 160° либо в собранном, либо в разобранном виде. В первом случае

длительность стерилизации 75 мин, во втором — 60 мин. Собранные шприцы вместе с иглой стерилизуют в пробирке, закрытой ватной пробкой, разобранные заворачивают в бумагу или ткань. Можно стерилизовать шприцы и в автоклаве при 1 ати в течение 15—20 мин. Автоклавируют их только в разобранном виде, иначе они повреждаются. Прокаливать шприцы нельзя, так как от этого они портятся.

Термостойкие приборы для культивирования микроорганизмов, а также детали к этим приборам, резиновые пробки и шланги стерилизуют в автоклаве. При этом емкости закрывают в бумагу. Режим автоклавирования выбирают в соответствии с термостойкостью материала, из которого сделан прибор.

Некоторые предметы (металлические инструменты, мелкие стеклянные детали, мембранные фильтры) иногда стерилизуют длительным (в течение 30—60 мин) кипячением в дистиллированной воде. Металлические и стеклянные предметы лучше всего кипятить в специальных закрытых сосудах — стерилизаторах. Можно использовать для этой цели и металлическую посуду. Мембранные фильтры обычно кипятят в колбе или химическом стакане, закрытых ватными пробками. Однако этим способом с целью стерилизации в микробиологической практике пользуются редко в связи с тем, что длительное кипячение может повредить обрабатываемый материал, а сокращение времени кипячения может не обеспечить стерильность, так как споры некоторых анаэробных микроорганизмов сохраняют жизнеспособность даже после кипячения в течение нескольких часов. Надежность стерилизации при кипячении может быть увеличена внесением в воду какого-либо бактерицидного средства: 2%-ного формальдегида, 0,1%-ной сулемы или 1%-ной бриллиантовой зелени. Но в этом случае возможно загрязнение биоцидами стерилизуемых предметов.

3.3.1. Стерилизация газообразными веществами

Аппаратуру, имеющую зеркальное, оптическое и радиоэлектронное оборудование, а также изделия из термолабильных пластмасс, например центрифужные пробирки, стерилизуют газовым методом. Для газовой стерилизации применяются только те соединения, которые обладают спороцидными свойствами. Это оксид этилена, метилбромид, оксид пропилена, формальдегид, глютаральдегид, бета-пропиолактон, озон и др. Особенно эффективна смесь оксида этилена и бромистого метила в массовом соотношении 1:1,44 (смесь «ОБ»).

Газовую стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся аппаратах. Стерилизуемые объекты, помещаемые в камеру, упаковывают, как при стерилизации в автоклаве или сушильном шкафу. Для упаковки используют материалы, не пор-

тящиеся в газовой среде и пропускающие газ и влагу: оберточную бумагу, муслин, хлорвиниловые и нейлоновые пленки. Перед введением в камеру биоцида из нее как можно полнее удаляют воздух, чтобы обеспечить тесный контакт активно действующего вещества со стерилизуемым объектом. При стерилизации строго контролируют концентрацию газа, давление, влажность, температуру и длительность экспозиции. В большинстве случаев процесс проводят в сочетании с некоторым повышением температуры (до 45—70°). Режимы стерилизации разными газами неодинаковы. Они определяются прежде всего свойствами биоцида. Имеет значение и конструкция стерилизационного аппарата. Оптимальный режим стерилизации смесью «ОБ» при 50° в аппарате емкостью 100 л и более следующий: концентрация смеси 3,36 г/л (давление 1,2 ати), относительная влажность 80—100%, продолжительность 24 ч. По окончании стерилизации удаляют газы из камеры с помощью вакуумного насоса и на некоторое время камеру оставляют под вакуумом для десорбции газов из стерилизованных предметов. После этого камеру заполняют стерильным воздухом. Предметами, простерилизованными газами, рекомендуется пользоваться не ранее чем через 24 ч после стерилизации. Это необходимо для полного удаления из них газа. Целесообразно на этот период поместить их в вытяжной шкаф или оставить в хорошо проветриваемом помещении. Некоторые изделия из пластмасс требуют дополнительной аэрации до 9 суток. При проведении газовой стерилизации строго соблюдают правила работы с ядовитыми газообразными веществами.

3.3.2. Стерилизация облучением

Для стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов используют различные виды излучений: инфракрасное, ультрафиолетовое, рентгеновские лучи, α -, β - и γ -лучи радиоактивных элементов. Чаще других в микробиологической практике используется ультрафиолетовое облучение. Мощность ультрафиолета измеряется в бактах. Доза УФ-излучения, губительная для различных видов микроорганизмов (кроме спор), составляет 5 мкб/см².

Основные способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов обобщены в табл. 6.

Следует отметить, что все большее распространение получают посуда и инструменты одноразового использования.

Способы стерилизации питательных сред, посуды и других лабораторных материалов

Стерилизуемый материал	Метод стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
1	2	3	4
Питательные среды с почвенной вытяжкой; картофельные и некоторые другие натуральные среды	автоклавирование	1,5—2 атн, 30 мин	в колбах, пробирках, бутылках и т. д., закрытых ватными пробками
Жидкие и агаризованные среды, не содержащие сахаров и других веществ, разлагающихся при 120°	автоклавирование	1 атн, 20 мин	то же
Жидкие и агаризованные среды, с сахарам и другими соединениями, не выдерживающими нагревания при 120°	автоклавирование	0,5 атн, 15—30 мин	то же
Среды или компоненты среды, не выдерживающие нагревания выше 100°	дробная стерилизация	текущий пар, 3 часа по 30—40 мин через сутки	то же
Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания, например, белки, некоторые витамины и аминокислоты	фильтрование через бактериальные фильтры	—	—
Вазелиновое масло, глицерин, тальк	горячим воздухом	160°, 2 ч или 170°, 1 ч	слой вещества в сосуде не должен превышать 1,5 см
Чашки Петри, пипетки, шпатели	горячим воздухом	160—170°, 2 ч	завернуты в бумагу (отверстия пипеток закрыты ватными тампонами)
Колбы, пробирки, химические стаканы, флаконы, стеклянные центрифужные пробирки, трубки Бурри	горячим воздухом	160—170°, 2 ч	закрыты ватными пробками

1	2	3	4
Шприцы	горячим воздухом	160°, 1 ч	разобраны и за- вернуты в бума- гу или ткань
		160°, 75 мин	в собранном виде, в пробирке, за- крытой ватной пробкой
	автоклави- рование	1 ати, 15—20 мин	разобраны и завернуты
Мембранные фильтры	автоклави- рование	1 ати, 15 мин	в сосуде с дистиллирован- ной водой
	кипячение	30 мин	то же
Фильтры Зейтца	автоклави- рование	1—1,5 ати, 20—30 мин	цилиндр держа- теля закрыт ватной пробкой, в отводной труб- ке ватный там- пон.
	горячим воздухом	160°, 1 ч	Верхняя часть за- вернута в бумагу
Свечи Шамберлана и Беркефельда	автоклави- рование	0,5—1 ати, 15 мин	можно вместе с держателем
	горячим воздухом	160—170°, 2 ч	закрыты ватными пробками, завер- нуты в бумагу и т. д., не долж- ны быть соеди- нены с новыми детальми
Стеклянные фильтры с держателем или отдельно	автоклави- рование	1 ати, 30 мин	закрыты ватными пробками, завер- нуты в пергамент и алюминиевую фольгу
Стеклянные фильтры без резиновых пробок	горячим воздухом	1 ати, 20—30 мин	заверну- ты в бумагу
Центрифужные пробирки, изготовленные из тер- молабильных пластмасс	газовая стерилиза- ция	зависит от применяе- мого био- цида	—
	ультрафио- летовыми лучами	время экс- позиции устанавли- вают экс- перимен- тально	пробирки после облучения хранят в стерильной посуде

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование микроорганизмов является одним из основных методов микробиологии. От умения культивировать микроорганизмы в лабораторных условиях в значительной степени зависят успехи их изучения и практического применения. Культивирование основано на знании физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов и понимании значения физико-химических условий среды, необходимых для их жизнедеятельности.

4.1. ПРИНЦИПЫ СОСТАВЛЕНИЯ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируют на питательных средах, поэтому питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Предложены сотни различных сред для культивирования микроорганизмов, состав которых определяется потребностями микроорганизмов в соединениях, необходимых для биосинтеза и получения энергии. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разнообразны, поэтому столь же разнообразны их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота. И именно эти соединения определяют специфичность подавляющего большинства питательных сред.

По потребностям в углероде микроорганизмы принято делить на две большие группы — автотрофы и гетеротрофы. Автотрофные микроорганизмы способны в качестве единственного источника углерода использовать углекислоту — соединение, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. В соответствии с этим при культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация углекислоты в воздухе не превышает 0,03% и ее поступления в среду за счет диффузии недостаточно для интенсивного роста микроорганизмов. Поэтому в среды для культивирования автотрофов вносят бикарбонат натрия (NaHCO_3) или карбонаты, чаще всего углекислый кальций (CaCO_3). В некоторых случаях через среду продувают воздух, обогащенный 1—5% углекислоты.

Потребности гетеротрофных микроорганизмов не могут быть удовлетворены только углекислотой. Для их развития среда должна содержать органические соединения. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмы-гетеротрофы способны использовать различные соединения углерода — кислоты, спирты, углеводы, углеводороды, ароматические соединения. При этом потребности некоторых микроорганизмов, например ряда бактерий из семейства *Pseudomonadaceae*, могут быть удовлетворены широким набором различных органических веществ, тогда как другие микроорганизмы характеризуются высокой специализацией и способностью использовать лишь немногие соединения углерода. Так, некоторые метаноокисляющие бактерии используют только метан и метанол.

Вторым основным компонентом питательной среды является источник азота. Азот входит в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме — в виде амина ($-\text{NH}_2$)- или имино ($-\text{NH}$)-групп. Тем не менее потребности микроорганизмов в источнике азота могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную степень восстановленности. Для очень многих микроорганизмов это могут быть соли аммония. В этом случае в среды вносят NH_4Cl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Следует, однако, помнить, что аммонийные соли — физиологически кислые соли, так как по мере использования иона аммония в среде накапливается анион соответствующей кислоты, что приводит к заметному возрастанию кислотности среды и может отрицательно повлиять на развитие микроорганизмов.

Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Питательные среды для культивирования таких микроорганизмов содержат KNO_3 или NaNO_3 . В отличие от солей аммония нитраты — физиологически щелочные соли, так как при использовании аниона NO_3^- в среде накапливаются катионы K^+ или Na^+ . Нитриты в кислых условиях для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника азота почти не используются.

Питательные среды для культивирования некоторых микроорганизмов должны включать одну, несколько или полный набор аминокислот. Отдельные аминокислоты в L- или DL-форме добавляют к стерильной среде в концентрации от 0,1 до 0,05 г на 100 мл непосредственно перед засевом ее микроорганизмами. Для этого рекомендуется использовать растворы аминокислот, в которых концентрация превышает содержание аминокислоты в среде в 100 раз. Глицин, аланин, пролин, лизин и орнитин растворяют в дистиллированной воде, фенилаланин и триптофан — в дистиллированной воде, подщелоченной NaOH , остальные аминокислоты — в дистиллированной воде, подкисленной HCl . Аминокислоты — цистин и цистеин, а также амиды — глутамин и аспарагин неустойчивы к нагреванию, поэтому их стерилизуют фильтрова-

нием. Остальные аминокислоты можно стерилизовать при 0,5 ати в течение 15 мин.

Потребности микроорганизмов в некоторых аминокислотах часто удовлетворяют, добавляя к среде гидролизат белка. Для получения гидролизатов используют белки животного (мясо, рыбу, желатину, казеин) или растительного (семена сои, подсолнечника) происхождения, а также клетки микроорганизмов (дрожжи, водоросли, бактерии). Гидролиз проводят с помощью протеолитических ферментов или кипячением с минеральными кислотами либо с крепкими щелочами. Состав гидролизатов неодинаков и зависит от исходного субстрата, а также способа получения. Чаще других используют гидролизат казеина, который готовят в лаборатории, как правило, кислотным гидролизом. Для этого 20 г казеина заливают 200 мл воды, добавляют 10 мл концентрированной H_2SO_4 и выдерживают в автоклаве 4 ч при 1,5 ати. Однако при этом подвергается коррозии оборудование автоклава, поэтому чаще гидролизат казеина получают иначе. К 200 г казеина добавляют 280 мл 6 н. раствора HCl и смесь кипятят с обратным холодильником 18 ч. Полученный гидролизат нейтрализуют 50%-ным раствором $NaOH$ до pH 7, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют при 0,5 ати 30 мин. Содержание аминного азота в гидролизате, полученном таким способом, составляет 700—1000 мг на 100 мл. Его добавляют к средам в таком количестве, чтобы концентрация по аминному азоту составляла 10—30 мг на 100 мл. Следует иметь в виду, что при кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан, в достаточно большой степени цистеин и незначительно серин и треонин. Имеется готовый препарат гидролизата казеина. Его вносят в среды от 1,0 до 0,1 г на 100 мл в зависимости от потребностей микроорганизмов.

Наиболее требовательные микроорганизмы культивируют на питательных средах, содержащих белки или продукты их неполного расщепления — пептоны, представляющие собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, органических азотных оснований, солей и микроэлементов. Пептоны получают в результате воздействия протеолитических ферментов на белки животного (мышечный белок, казеин) или растительного (белок соевой муки) происхождения. В отечественных лабораториях чаще всего используют ферментативный пептон, выпускаемый Семипалатинским заводом. Это гигроскопический порошок светло-желтого цвета, полностью растворимый в воде; 1%-ный раствор пептона имеет нейтральную или слабокислую реакцию. В питательные среды пептон добавляют от 1—2 до 20 г на 1 л.

Необходимо иметь в виду, что аминокислоты и пептон микроорганизмы могут использовать не только как источник азота, но и как источник углерода и энергии.

Некоторые бактерии способны использовать в качестве единственного источника азота молекулярный азот N_2 . Это азотфиксаторы. В среды для культивирования таких микроорганизмов соединений азота можно не вносить. Снабжение азотфиксаторов га-

зобразным азотом осуществляется благодаря соприкосновению среды с воздухом или культивированию в атмосфере азота.

Многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, пурины, пиримидины и аминокислоты. Чтобы подчеркнуть потребность микроорганизмов в факторах роста, принято использовать термин «прототрофы» и ауксотрофы». Прототрофы не нуждаются в факторах роста, для ауксотрофов абсолютно необходимо наличие в среде одного или нескольких факторов роста. Этими терминами особенно широко пользуются в литературе по генетике. Если потребности микроорганизмов в факторах роста ограничены одним или несколькими витаминами, то рекомендуется вносить их в культуральные среды, используя следующие концентрации: тиамин (витамин В₁), пантотенат Са, рибофлавин (витамин В₂), никотиновая кислота (ниацин), пиридоксин, пиридоксамин, холин, кобаламин (витамин В₁₂) — по 1мкг на 1 мл среды; фолиевая кислота и *n*-аминобензойная кислота — по 0,05 мкг на 1 мл среды; биотин — 0,005 мкг на 1 мл среды.

Витамины добавляют к стерильной среде непосредственно перед ее засевом. Для этого рекомендуется использовать растворы, в которых концентрация витамина превышает его содержание в питательной среде в 100 раз. Растворы готовят в стерильной посуде и используют стерильную дистиллированную воду. Исключение составляют рибофлавин и фолиевая кислота. Рибофлавин растворяют в 0,02 н. уксусной кислоте, а фолиевую кислоту — в 0,01 н. NaOH, доводя затем концентрацию NaOH в растворе до 0,001 н. Полученные растворы стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане 3 мин. Раствор тиамина рекомендуется стерилизовать фильтрованием, так как при нагревании тиамин разрушается. При температуре +4° растворы витаминов сохраняются не менее месяца. Растворы фолиевой кислоты, пиридоксина и рибофлавина сохраняют в темноте, так как они светочувствительны.

Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, а также кукурузный экстракт. Дрожжевой экстракт вносят в среду для культивирования от 0,05 до 0,5 г на 100 мл, дрожжевой автолизат — в таком количестве, чтобы концентрация аминного азота составляла 5—30 мг на 100 мл среды. Дрожжевой экстракт имеется в продаже. Дрожжевой автолизат готовят следующим образом: 40 г свежих прессованных или 10 г сухих дрожжей заливают водой и перемешивают до получения гомогенной массы, затем добавляют несколько кристаллов тимола или 1—2 мл хлороформа и выдерживают в термостате при 50—55° 3 суток. За это время клетки дрожжей отмирают, а ферменты остаются активными и гидролизуют белки, а также другие биополимеры. Через 3 суток полученный автолизат после тщательного перемешивания кипятят на слабом огне 20 мин и фильтруют через бумажную пульпу, используя воронку Бюхнера. Содержание аминного азота определя-

ют формольным титрованием. Дрожжевой автолизат стерилизуют при 0,5 ати 15 мин и сохраняют в холодильнике.

Кукурузный экстракт — готовый продукт заводов крахмалопаточной промышленности. Он содержит аминокислоты, витамины, большое количество органических кислот (молочной, уксусной и муравьиной) и минеральные соли. Кукурузный экстракт вносят в среды от 0,2 до 5%; стерилизуют при 0,5 ати.

Кроме источников углерода, азота и факторов роста микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы сера, фосфор и ряд других элементов. Все они должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Потребности разных групп микроорганизмов в сере, фосфоре и других зольных элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Поэтому «минеральный фон» сред для культивирования многих микроорганизмов может быть близким по составу. Так, потребности значительного числа микроорганизмов в сере удовлетворяются сульфатами, хотя в клетке сера находится в основном в восстановленной форме, в виде сульфгидрильных групп. Значительно реже встречаются микроорганизмы, требующие наличия в среде восстановленной серы. В этом случае в среду вносят сульфиды, чаще всего Na_2S , или органические соединения, содержащие сульфгидрильные группы, например цистеин.

Соли фосфорной кислоты удовлетворяют потребности микроорганизмов в фосфоре. Все необходимые металлы — K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu — и другие элементы микроорганизмы получают в форме катионов или анионов неорганических солей. Например, источником магния служит MgSO_4 , источником натрия и хлора — NaCl, кальция — CaCO_3 или CaCl_2 . Железо добавляют к средам в виде хлорида, сульфата или цитрата.

Чтобы избежать выпадения осадка в результате образования нерастворимых комплексов фосфатов с некоторыми катионами, особенно с железом и кальцием, к средам рекомендуется добавлять от 0,001 до 1 г/л этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) или гексаметафосфата натрия в концентрации 4 г/л. Комплексы, образуемые этими соединениями с катионами, служат резервом, из которого в результате диссоциации в раствор поступают свободные катионы.

Калий, магний, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, поэтому их соли, как правило, включают в состав питательных сред. Потребности микроорганизмов в марганце, молибдене, цинке, меди, кобальте очень малы. Эти элементы, часто называемые микроэлементами, вносят в среды от 1 мг до 1 мкг на 1 л; более высокие концентрации могут быть токсичны. Питательные среды с пептоном, почвенной вытяжкой, дрожжевым экстрактом, гидролизатом казеина содержат необходимые микроэлементы. В состав синтетических сред, которые готовятся на дистиллированной воде, их следует вносить. Об оптимальных концентрациях микроэлементов для разных микроорганизмов известно мало, поэтому предложены различные по составу смеси микроэлементов. Растворы микроэлементов рекомендуется стерили-

лизовать отдельно и вносить в среду непосредственно перед ее засевом.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов кроме соединений, необходимых для процессов биосинтеза, должны включать и энергетический материал. По способу получения энергии все микроорганизмы принято делить на две основные группы: хемотрофы и фототрофы.

Хемотрофы используют энергию окисления различных соединений. В зависимости от окисляемого субстрата (донора водорода) среди хемотрофных организмов выделяют хемолитотрофы и хемоорганотрофы. Первые окисляют неорганические соединения, такие как H_2S , S° или другие не вполне окисленные соединения серы, H_2 , NH_4^+ , NO_2^- или Fe^{2+} .

Для хемоорганотрофов энергетическим субстратом служат органические вещества, которые обычно играют двойную роль, являясь одновременно и источником углерода и источником энергии. Однако есть микроорганизмы, которые для конструктивных и энергетических процессов нуждаются в разных соединениях. Например, гомоферментативные молочнокислые бактерии получают энергию при сбраживании сахаров, но почти не используют их в процессах биосинтеза. Для конструктивных целей им необходимы готовые аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины.

Фототрофы используют энергию света. Чтобы удовлетворить потребности этих бактерий в энергии, их культивируют при естественном или искусственном освещении.

По составу принято выделять естественные, или натуральные, среды и синтетические среды.

Натуральными называют среды, в состав которых входят продукты животного или растительного происхождения. К таким средам относятся овощные или фруктовые соки, животные ткани, разведенная кровь, молоко, воды морей, озер и минеральных источников, отвары или экстракты, полученные из природных субстратов, таких как мясо, почва, навоз, различные части растений, клетки микроорганизмов.

На натуральных средах хорошо растут многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей. К числу натуральных сред, широко применяемых в лабораторной практике, относятся мясо-пептонный бульон, неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенный экстракт.

Мясо-пептонный бульон (МПБ). Основой для его приготовления служит мясная вода, которую готовят следующим образом: 500 г мяса, освобожденного от костей, жира и сухожилий, мелко нарезают или пропускают через мясорубку, заливают 1 л водопроводной воды и оставляют при комнатной температуре на 12 ч или в термостате при 30° на 6 ч, а при 37° — на 2 ч. За это время из мяса экстрагируются различные вещества, в том числе водорастворимые витамины. Затем мясо отжимают через марлю, и полученный настой кипятят 30 мин. При этом свертываются белки. Остывшую массу фильтруют через ватный фильтр и доливают водой до первоначального объема. К мясной воде добавляют 1% пептона и 0,5% NaCl.

МПБ — богатая питательная среда, но она почти не содержит углеводов. В случае необходимости их добавляют к МПБ чаще всего в количестве 1—2 г на 100 мл. МПБ стерилизуют при 1 ати.

Солодовое (неохмеленное пивное) сусло — хорошая среда для некоторых молочнокислых и уксуснокислых бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов и других представителей гетеротрофных микроорганизмов. Основные компоненты сусла — углеводы (до 90% от общей массы сухого остатка) и азотсодержащие соединения (до 6—7% от общей массы сухого остатка). Из углеводов в наибольшем количестве содержатся мальтоза и декстрины. В состав сусла входят витамины, преимущественно группы В, органические кислоты и минеральные соли.

Сусло готовят следующим образом. 250 г размолотого солода заливают 1 л водопроводной воды, нагревают до 48—50° и поддерживают эту температуру в течение получаса, непрерывно помешивая смесь, чтобы избежать образования комков. В последующие полчаса температуру поднимают до 55—58° и поддерживают на этом уровне до полного осахаривания крахмала, т. е. до тех пор, пока реакция остывшей смеси с йодом будет отрицательной. При указанном режиме происходит также гидролиз белков до аминокислот и пептидов. Полученный экстракт фильтруют через бумажную пульпу или вату. В фильтрате определяют концентрацию сахара, пользуясь ареометром Баллинга, градусы (°Б) которого примерно соответствуют процентному содержанию сахара в сусле. До нужной крепости сусло доводят водопроводной водой. Для культивирования микроскопических грибов чаще всего используют 3—4° Б сусло, для дрожжей — 6—8° Б, а для наиболее требовательных молочнокислых бактерий — 8—12° Б сусло. Сусло стерилизуют при 0,5 ати 30 мин.

Дрожжевая среда используется для культивирования ряда гетеротрофных микроорганизмов. Основа дрожжевой среды — дрожжевая вода. Для ее приготовления 70—100 г свежих прессованных или 7—10 г сухих дрожжей 30 мин кипятят в 1 л воды и после осаждения клеток дрожжей жидкость декантируют или фильтруют через вату. К фильтрату добавляют 1 л воды, еще раз 30 мин кипятят и вновь фильтруют. К 100 мл полученной дрожже-

вой воды добавляют 1—2 г углеводов и минеральные соли, чаще всего K_2HPO_4 (0,1 г) и NaCl (0,5 г). Доводят рН среды до 6,8—7,2. Среду стерилизуют при 0,5 ати 20—30 мин.

Картофельная среда используется в основном для культивирования спорообразующих бактерий, представителей рода *Caulobacter* и некоторых других хемоорганотрофных бактерий. Для приготовления этой среды 200 г тщательно вымытого и очищенного от кожуры и глазков картофеля нарезают мелкими ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды и кипятят 20—30 мин. Отвар фильтруют через вату, доводят объем фильтрата до 1 л и разливают в сосуды для культивирования. Среду стерилизуют 1 ч при 1 ати или 30 мин при 1,5 ати.

Почвенный экстракт используют главным образом для культивирования разнообразных представителей почвенных микроорганизмов. Для его приготовления 500 г плодородной почвы заливают 1,5 л водопроводной воды и автоклавируют при 1 ати 30 мин. Полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр, добавляют к горячему фильтрату 0,5 г $CaCO_3$, тщательно перемешивают и через 5—7 мин фильтруют вновь. К экстракту, как правило, добавляют 0,2 г K_2HPO_4 .

Синтетические среды — это среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Синтетические среды широко используют при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов. Для разработки состава синтетических сред, обеспечивающих рост микроорганизмов или усиленный биосинтез какого-либо продукта жизнедеятельности, необходимо знать особенности обмена веществ данного организма и потребности его в источниках питания. В распоряжении микробиологов имеется достаточное количество синтетических сред, не уступающих по своим качествам натуральным средам неопределенного состава. Синтетические среды могут иметь относительно большой набор компонентов, но могут быть и довольно простыми по составу. Рецепты некоторых синтетических сред приведены в приложении.

Наряду с натуральными и синтетическими средами выделяют так называемые полусинтетические среды. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава — углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и т. д. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой автолизат, почвенный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Следует иметь в виду, что среды, обеспечивающие хорошее развитие микроорганизмов, не всегда подходят для решения других исследовательских и практических задач, так как далеко не во всех случаях накопление какого-либо продукта жизнедеятель-

ности — фермента, витамина, антибиотика и т. д. — идет параллельно накоплению биомассы. Нередко при обильном росте микроорганизмов желаемый продукт метаболизма почти не образуется или образуется в недостаточном количестве. Чтобы обеспечить образование необходимого соединения в максимально возможных количествах, применяют специальные среды. Подбор концентрации и соотношения компонентов среды осуществляют, используя методы математического планирования эксперимента, которые достаточно подробно изложены в книге В. Н. Максимова (1980).

Дифференциально-диагностические (индикаторные) среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Примером индикаторной среды для выявления бактерий из группы кишечной палочки в естественных субстратах может служить агаризованная среда Эндо следующего состава, г: пептон — 10; лактоза — 10; K_2HPO_4 — 3,5; $NaHSO_3$ — 2,5; агар — 150; вода дистиллированная — 1000 мл; рН 7,4. К среде добавляется 4 мл 10%-ного спиртового раствора основного фуксина. Среду стерилизуют при 1 атм 15 мин и сохраняют в темноте. Бактерии из рода *Escherichia* на этой среде образуют малиновые колонии с металлическим блеском.

При определении видовой принадлежности бактерий используют рН-индикаторные среды, в состав которых входит один из индикаторов — нейтральный красный (0,0005%), феноловый красный (0,005%) или бромтимоловый синий (0,0005%). Если развитие микроорганизмов сопровождается образованием кислоты или щелочи, цвет индикатора изменяется. Дифференциально-диагностические среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие и плотные среды.

Жидкие среды широко применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, а также для поддержания и сохранения в коллекции культур микроорганизмов.

Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений, а также в коллекциях для сохранения культур микроорганизмов. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропи-танный питательным раствором.

Плотные среды используют для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, для определения количества микроорганизмов, их антибиотической активности, для хранения культур в коллекциях и в ряде других случаев. С целью уплотнения сред применяют агар или желатину. Плотной основой

могут служить пластинки силикагеля, которые пропитывают питательной средой.

Агар используют для уплотнения сред особенно часто. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входит агароза и агаропектин. Кроме того, агар включает небольшое количество легко ассимилируемых веществ и различные соли. Агар получают из некоторых морских водорослей и выпускают в виде пластин, стевельков или порошка. Агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при 100° и затвердевает при температуре 40° . Поэтому на агаризованных средах можно культивировать значительную часть известных микроорганизмов.

Чаще всего агар добавляют к средам в количестве 1,5%. Если необходимо получить более влажную среду, вносят 1,0%, а более плотную и сухую — 2—3% агара. Среду с агаром нагревают на кипящей водяной бане до полного его расплавления. Если предполагают выращивать микроорганизмы на скошенной агаризованной среде в пробирках, то каждую пробирку заполняют средой не более чем на 1/3. Чтобы среда не подсыхала, ее скашивают после стерилизации, перед посевом. Для этого пробирки с расплавленной в кипящей водяной бане средой устанавливают в наклонном положении (рис. 36) и дают среде застыть. Скошенная агаризованная среда не должна доходить до ватной пробки на 4—6 см. Среду, предназначенную для культивирования бактерий в чашках Петри, разливают по 20—25 мл в пробирки большего объема, чем для скошенной агаризованной среды, или стерилизуют в колбах. В последнем случае до стерилизации агар не расплавляют.

Агар имеет слабощелочную реакцию, поэтому его добавление может привести к незначительному повышению рН среды. В слабокислых, нейтральных или слабощелочных средах агар сохраняет способность образовывать гель после нескольких циклов плавления и затвердевания и даже после повторной стерилизации. Однако необходимо помнить, что при рН среды ниже 5,5 агар при стерилизации частично гидролизуеться и поэтому теряет способность образовывать гель, т. е. не застывает. В этом случае его стерилизуют отдельно от среды в определенном объеме воды, расплавляют на водяной бане и приливают при постоянном перемешивании к стерильной, предварительно подогретой среде.

Агар, как указывалось выше, содержит примеси органических и минеральных веществ, которые иногда нежелательны. Чтобы избавиться от большинства из них, поступают следующим образом. Агар заливают водопроводной

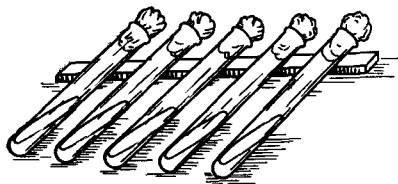


Рис. 36. Приготовление скошенной агаризованной среды в пробирках

водой и ставят в термостат на 30—37°. Примеси вымываются в воду и разлагаются под действием развивающихся в ней микроорганизмов. Через день-два жидкость сливают, агар промывают несколько раз свежей водой, снова заливают водой и вновь ставят в термостат. Когда и эта вода помутнеет, то ее опять заменяют новой, и так делают до тех пор, пока не исчезнет запах, а вода не перестанет мутнеть. Обычно через 2—3 недели, получают агар, почти лишенный растворимых органических и минеральных веществ. Воду сливают, агар помещают в двойной марлевый мешок и 2—3 суток промывают проточной водопроводной водой, затем раскладывают его тонким слоем и просушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 40—50°.

Эффективно заменять агар может более дешевый каррагенан, экстрагируемый из определенных видов красных морских водорослей. Каррагенан не разрушается большинством видов микроорганизмов. Из него можно готовить гели, устойчивые к температурам до 60°. Среды с каррагенаном готовят, как и среды с агаром. После добавления каррагенана к основной жидкой среде ее кипятят, чтобы полностью растворить его, а затем стерилизуют автоклавированием. Стерильную среду охлаждают до 55—60°, разливают в чашки и дают застыть. Для гелей, устойчивых при 60°, добавляют 2,4% каррагенана, при 45° — 2,0%.

Иногда для экономии агара используют его смесь с полиакриламидами (Serafan NP-10, пластагар) в соотношении 1:1.

Желатина — это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном — белком костей, хрящей, сухожилий, чешуи. Образуемый желатиной гель плавится при температуре 25°, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30—37°). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, которые многие микроорганизмы выделяют в среду. Эти свойства желатины ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства. Желатину используют главным образом в диагностических целях — для выявления протеолитической активности микроорганизмов, а также для получения гигантских и глубоких колоний дрожжей. В первом случае употребляют мясо-пептонную, во втором — сусловую желатину.

К жидким средам добавляют 10—20% желатины, оставляют набухать 5—10 мин и нагревают на водяной бане до растворения. Доводят рН среды до 6,8—7,0. Желатина имеет кислую реакцию и обладает большой буферностью, поэтому на ее нейтрализацию идет больше щелочи, чем, например, на нейтрализацию МПА. Желатиновые среды стерилизуют при 0,5 атм 15 мин или дробно — 3 раза по 20 мин в кипятильнице Коха. Повторная стерилизация желатиновых сред, особенно при рН сред ниже 6,0 или выше 7,3 не рекомендуется, поскольку желатина частично гидролизуется и теряет гелеобразующие свойства.

Кремнекислый гель (силикагель) используют иногда как твердую основу для синтетических сред. Гель готовят следующим образом. К соляной кислоте плотностью 1,1 добавляют при

перемешивании равный объем раствора жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) той же плотности. Смесь разливают в чашки Петри по 20—30 мл в каждую и оставляют чашки на горизонтальной поверхности на несколько часов до образования кремнекислого геля. Когда гель станет плотным, открытые чашки помещают в стеклянный или эмалированный сосуд, промывают 2—3 суток проточной водой для удаления хлоридов, а затем несколько раз горячей дистиллированной водой. Об отсутствии хлоридов судят по качественной пробе промывных вод с 1—5%-ным раствором азотнокислого серебра: при наличии хлоридов образуется белый осадок. Отмытые от хлора пластинки пропитывают 2—3 мл концентрированной среды, содержание компонентов в которой в 5—10 раз выше, чем в соответствующей среде. Затем чашки с гелевыми пластинками помещают открытыми в сушильный шкаф и подсушивают при 50—60°, следя за тем, чтобы гель не растрескался и его поверхность осталась влажной. Если необходимо, чашки закрывают в бумагу и, не переворачивая, стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм 15 мин. Пластинки, предназначенные для выделения и культивирования автотрофных бактерий, можно не стерилизовать. Стерилизуют только среду, которой пропитывают гель. Чашки с силикагелевыми пластинками до употребления сохраняют под водой.

Некоторые особенности агара, желатины и кремнекислого геля суммированы в табл. 7.

Таблица 7

Основные особенности веществ, употребляемых для уплотнения питательных сред

Показатели	Агар	Желатина	Кремнекислый гель
Исходный материал для получения	морские водоросли	кожа, кости, хрящи	кремнекислый калий или натрий и соляная кислота
Основные компоненты	полисахариды	белки	кремневая кислота
Температура плавления, °С	100	22—25	—
Температура застывания, °С	40	22—25	—
Действие протеаз	не действуют	действуют	не действуют
Конденсационная вода	выделяется	не выделяется	не выделяется
Употребляемая концентрация, %	1,0—3,0	10—20	—

Осветление сред. Осветленные агаризованные или желатиновые среды необходимы для некоторых специальных исследований, например для получения хорошо видимых изолированных колоний анаэробных микроорганизмов.

В ряде случаев прозрачную среду можно получить, отфильтровав ее от осадка через гигроскопическую вату. Когда этого бывает недостаточно, среды осветляют с помощью белков куриного яйца. Для осветления 500 мл среды достаточно белка одного яйца. Белок отделяют от желтка и встряхивают с равным объемом воды до образования сплошной пены. Взбитый белок выливают в предварительно расплавленную и остуженную до 45—50° среду. Перед внесением белка проверяют рН и, если необходимо, подщелачивают среду до рН 7,0—7,3. Среду с белком тщательно перемешивают и прогревают при 100° в автоклаве или кипятильнике Коха в течение часа. Белок свертывается и адсорбирует все взвешенные в среде частицы. Когда свернувшийся белок поднимается на поверхность или опустится вниз, среду быстро отфильтровывают в горячем виде через вату. При этом удобно пользоваться специально подогреваемыми подставками для воронок, благодаря которым предотвращается застывание среды во время фильтрации.

Синтетические агаризованные среды, в которые вносить белок нежелательно, осветляют следующим образом. Среду наливают в химический стакан, автоклавируют и оставляют после стерилизации в закрытом автоклаве на 10—12 ч, обычно на ночь. При таком медленном остывании все взвешенные частицы оседают на дно. Застывшую агаризованную среду извлекают из стакана, верхнюю (прозрачную часть) срезают, помещают в колбу и вновь стерилизуют

* *
* *

Посуда, предназначенная для приготовления сред и культивирования микроорганизмов, не должна содержать посторонних веществ. Лучше всего пользоваться стеклянной посудой. Новую стеклянную посуду моют и погружают на ночь в 1—2%-ный раствор соляной или серной кислоты, затем многократно промывают водой и высушивают. Иногда для работы с микроэлементами, витаминами, синтетическими и другими средами требуется особо тщательная очистка посуды. Натуральные среды неопределенного состава можно готовить в эмалированной посуде.

Не следует готовить впрок больших запасов сред, так как они высыхают, концентрируются и становятся непригодными. Сохраняют среды в прохладном, защищенном от света и не слишком влажном помещении. В сырости ватные пробки пропитываются влагой и через них может прорасти мицелий микроскопических

грибов. Каждый сосуд со средой должен иметь этикетку с обозначением состава (названия) среды и времени ее приготовления.

4.2. УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для роста микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как кислотность среды, аэрация, температура, свет, влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы.

4.2.1. Активная кислотность среды

Активная кислотность (рН) среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов. Большинство бактерий лучше всего растут при рН, близком к 7,0, напротив, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среды. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определить значение рН. Измеряют рН электрометрическим методом на потенциометре. В лабораторной практике удобно использовать различные жидкие или бумажные индикаторы (см. Приложение). Широко применяется, например, жидкий двухцветный индикатор, бромтимоловый синий (бромтимолблау). Его цвет изменяется от желтого к синему при сдвиге рН от 6,0 до 7,6. При рН 7,3 индикатор имеет сине-зеленую окраску. Используют также универсальный индикатор, который изменяет окраску в интервале рН от 2 до 10.

В случае необходимости рН сред доводят до нужного значения растворами кислот (HCl , H_2SO_4), щелочей (NaOH , KOH) или солей, имеющих щелочную реакцию (Na_2CO_3 , NaHCO_3). Для корректировки рН целесообразно иметь растворы разной концентрации. Значение рН сред может измениться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести до нужного, если это требуется, стерильными растворами кислоты или щелочи.

Активная кислотность питательной среды, благоприятная для начала роста микроорганизмов, часто меняется в процессе культивирования микроорганизмов. Эти изменения могут быть результатом образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления отдельных компонентов среды. Например, при сбраживании углеводов в среде накапливаются органические кислоты, снижающие рН среды. В средах с KNO_3 рН возрастает, как уже отмечалось, благодаря более интенсивному потреблению нитрата и накоплению ионов калия.

Чтобы не допустить чрезмерного изменения рН в культурах микроорганизмов и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы (см. Приложение). В микробиологической практике ча-

ше других применяют фосфатные буферы. Однако если рост микроорганизмов сопровождается образованием большого количества кислот, то тех количеств буферного раствора, которые можно добавлять к средам (не более 5 г фосфатов на 1 л среды), оказывается недостаточно, так как противодействие любого буфера изменению рН не беспредельно. Поэтому для микроорганизмов, активно изменяющих кислотность среды, применение буферов, неэффективно. При культивировании таких микроорганизмов в среды вводят избыточное количество мела, который нейтрализует образующиеся кислоты. Можно нейтрализовать образующиеся кислоты по ходу развития культуры 10%-ным стерильным раствором NaHCO_3 .

Поддержание определенного значения рН во время роста особенно важно для тех микроорганизмов, которые образуют в процессе жизнедеятельности кислоты, но не обладают устойчивостью к ним. К их числу относятся молочнокислые бактерии, а также многие псевдомонады. Большие затруднения встречаются, когда нужно поддерживать рН в слабощелочных средах, так как для диапазона рН от 7,2 до 8,5 подходящих буферов не существует. Поэтому иногда приходится периодически или непрерывно доводить рН до нужной величины, добавляя стерильно в среду растворы кислоты или щелочи при постоянном контроле значения рН. В современных ферментерах это достигается с помощью специальных автоматических устройств.

4 2.2. Аэрация

Кислород входит в состав воды и многих соединений, поэтому поступает в клетки всегда в больших количествах. Однако значительная часть микроорганизмов нуждается в постоянном притоке молекулярного кислорода. Такие микроорганизмы принято объединять в группу облигатных аэробов. Энергетическим процессом у них является аэробное дыхание, а молекулярный кислород играет роль терминального окислителя. Среди облигатных аэробов выделяют группу микроаэрофильных микроорганизмов, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении O_2 меньше, чем в воздухе. Развитие других микроорганизмов, напротив, возможно только в отсутствие кислорода. Получение энергии у этих микроорганизмов не связано с использованием молекулярного кислорода. Для многих из них кислород токсичен — он угнетает рост или вызывает гибель клеток. Такие микроорганизмы называют облигатными анаэробами. Среди микроорганизмов выделяют также группу факультативных анаэробов, представители которой способны расти как в присутствии, так и в отсутствие молекулярного кислорода. Например, некоторые дрожжи или энтеробактерии в зависимости от наличия кислорода осуществляют аэробное дыхание или брожение.

Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия и в способах их культивирования.

Культивирование на поверхности плотных и жидких сред. В этом случае микроорганизмы выращивают на поверхности плотной среды или в тонком слое жидкой среды, и кислород поступает к ним непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании важно увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом. Для этого среды наливают тонким слоем в посуду с широким дном — чашки Петри, колбы Виноградского, матрацы (см. рис. 30). В жидких средах аэробные микроорганизмы часто растут, образуя на поверхности пленку. Факультативные анаэробы развиваются не только на поверхности, но и в толще жидкой среды, вызывая более или менее равномерное ее помутнение. Поверхностное культивирование микроорганизмов применяется как в лабораторных условиях, так и в промышленности.

Глубинное культивирование в жидких средах. Все способы глубинного культивирования аэробных микроорганизмов сводятся к увеличению поверхности соприкосновения питательной среды с кислородом воздуха. Следует иметь в виду, что при глубинном культивировании в жидких средах микроорганизмы используют растворенный кислород. Вместе с тем растворимость кислорода в воде невелика, поэтому, чтобы обеспечить рост аэробных микроорганизмов в толще среды, ее необходимо постоянно аэрировать. При аэрировании среды учитывают два показателя: интенсивность аэрации и степень аэрации. Интенсивность аэрации характеризуется скоростью растворения кислорода в единице объема культуральной среды за единицу времени. Степень аэрации — это объем воздуха, продуваемый через определенный объем среды за единицу времени.

Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования — выращивание на качалках, обеспечивающих встряхивание или вращение колб или пробирок со скоростью 100—200 и более оборотов в минуту. Чем больше скорость вращения, тем больше соприкосновение среды с воздухом и выше насыщение ее кислородом. Увеличить аэрацию среды при работе на одной и той же качалке можно уменьшением объема среды или применением колб с отбойниками — вдавливаниями внутрь в виде 4—8 отростков 2—3 см длиной (см. рис. 30). При вращении колб с отбойниками поверхность соприкосновения среды с воздухом заметно увеличивается благодаря разбрызгиванию жидкости. Чем больше отбойников, тем сильнее разбрызгивание жидкости, тем выше аэрация.

Интенсивность аэрации при выращивании микроорганизмов на качалках характеризуют, как правило, скоростью поглощения кислорода водным раствором сульфита. Раствор сульфита наливают в сосуды для культивирования вместо питательной среды и через определенные промежутки времени измеряют количество окисленного сульфита в тех же условиях аэрации, при которых выращиваются исследуемые микроорганизмы. Метод подробно описан в

«Практикуме по микробиологии» (1976). Сульфитный метод не дает возможности определить концентрацию кислорода в культуре. Концентрацию кислорода, растворенного в культуральной жидкости, определяют полярографически.

Помимо перемешивания аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием через толщу среды стерильного воздуха. Этот способ часто используют в лабораторных исследованиях, но особенно широкое применение он нашел в промышленной микробиологии при получении биомассы и различных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов — антибиотиков, ферментов, кислот. Скорость протекания воздуха через среду необходимо контролировать. Для этого используют различные приборы: газовые часы, ратометры и др. В ферментерах количество пропускаемого воздуха поддерживают на заданном уровне автоматически. Воздух стерилизуют путем прохождения через активированный древесный уголь, стеклянную вату, пропитанную антисептиком, или специальные ткани из полимеров. В лабораторных

опытах, когда объем и скорость поступления воздуха невелики, используют заранее простерилизованные ватные фильтры. Для возможно более сильного распыления воздух пропускают через мелкопористые пластинки — барботеры; в лабораторных опытах с этой целью применяют стеклянные фильтры.

Для аэрации культур микроорганизмов, как правило, используют обычный воздух. Продувание сред кислородом в лабораторных условиях не рекомендуется, так как чрезмерное насыщение среды кислородом (до 40 мг/л) может привести к угнетению роста микроорганизмов. В ферментерах принудительную аэрацию обычно совмещают с механическим перемешиванием среды мешалками, скорость вращения которых может достигать сотен и даже тысяч оборотов в минуту. Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов приведена на рис. 37.

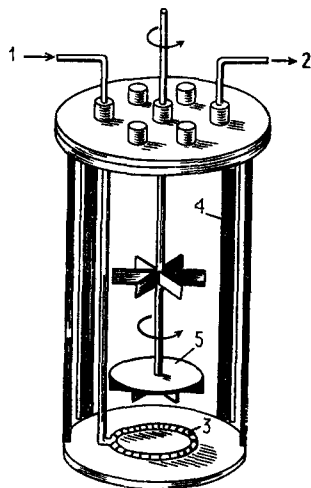


Рис 37 Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов

1 — вход воздуха, 2 — выход воздуха, 3 — барботер, 4 — отбойники, 5 — мешалка

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выращивание анаэробных микроорганизмов более сложно, чем культивирование аэробов, так как соприкосновение клеток анаэробов с кислородом воздуха должно быть сведено к минимуму или даже полностью исключено. Для этого используют разные приемы, нередко комбинируя их друг с другом.

Выращивание в высоком слое среды. Это наиболее простой способ ограничения доступа воздуха к клеткам микроорганизмов. Жидкую среду наливают в сосуды для культивирования высоким слоем. Так как нельзя стерилизовать среды, если они занимают более половины высоты сосуда, часть среды стерилизуют отдельно и стерильно доливают ею сосуд для культивирования сразу же после посева. Непосредственно перед посевом среду кипятят или прогревают на кипящей водяной бане 30—40 мин, затем быстро охлаждают, чтобы в ней не успел раствориться кислород воздуха, и вносят на дно посевной материал.

Культивирование в вязких средах. Диффузия кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости. Поэтому в вязких средах, таких как картофельная или среды с кукурузной либо другой мукой, хорошо развиваются некоторые облигатные анаэробы, например, возбудители маслянокислого или ацетонобутилового брожения. Вязкость жидких сред легко увеличить, если добавить к ним 0,2—0,3% агара.

Выращивание в толще плотной среды. Этим приемом пользуются для получения изолированных колоний при выделении чистых культур или определении численности анаэробных микроорганизмов. Посевной материал вносят в расплавленную и остуженную до 48—50° агаризованную, желательно осветленную среду, тщательно перемешивают и оставляют в пробирках или переливают стерильной пипеткой в заранее простерилизованные трубки Бурри или чашки Петри. Поверхность среды в пробирках заливают парафином. Трубки Бурри — это стеклянные трубки длиной 20—25 см, диаметром 1,0—1,5 см. Трубки стерилизуют, закрыв оба конца ватными пробками. Перед посевом ватную пробку у одного конца заменяют стерильной резиновой, через другой конец трубки вносят среду с посевным материалом и закрывают также резиновой пробкой (рис. 38).

При использовании чашек Петри для выращивания анаэробов засеянную агаризованную среду наливают в крышку чашки и, после того как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки, где среда соприкасается с воздухом, заливают стерильным парафином (рис. 39).

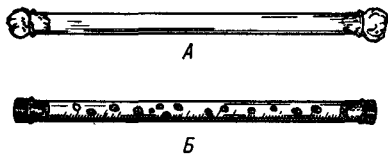


Рис. 38. Трубка Бурри:
А — трубка, подготовленная к стерилизации; Б — колонии анаэробных микроорганизмов в толще агаризованной среды

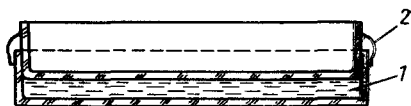


Рис. 39. Культивирование анаэробов в чашке Петри:
1 — агаризованная среда; 2 — парафин

Выращивание в анаэро­статах. Анаэробные микроорганизмы можно выращивать в анаэро­статах — вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Анаэро­статом может служить обычный вакуумный стеклянный эксикатор. Из анаэ­ростата откачивают воздух, а затем, как правило, заполняют его газовой смесью, состоящей из азота (90—80%) и углекислоты (10—20%), до давления порядка $67 \cdot 10^3$ Па (500 мм рт. ст.). Избыточное давление исключает возможность диффузии кислорода воздуха.

Некоторые строгие анаэробы, например, метанобразующие бактерии, ацетогены, некоторые грибы, расщепляющие целлюлозу, микроорганизмы рубца жвачных животных, погибают даже при кратковременном контакте с кислородом воздуха. Работа с такими микроорганизмами представляет большие трудности и требует специального оборудования. Для культивирования строгих (облигатных, экстремальных) анаэробов необходимо применять методы, позволяющие исключать молекулярный кислород из сред культивирования, создавать и поддерживать в них низкий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП). С этой целью используют технику, разработанную профессором Хангейтом (Hun­gate): 1) среды для выращивания микроорганизмов и все добавки в них готовят перед автоклавированием с максимальной защищенностью от контакта с кислородом (кипячение и т. д.); 2) после автоклавирования среды и добавки для них немедленно охлаждают в токе стерильного газа, освобожденного от следов кислорода пропус­канием над медными стружками, нагретыми до 350—400 °С; 3) до посева микроорганизмов в среды добавляют восстановители (цистеин, сульфид натрия, тиогликолат в щелочной среде) для химического поглощения следов кислорода, диффундирующего в со­уды для культивирования даже через резиновые пробки; 4) посе­вы, разлив сред, в том числе агаризованных, проводят в токе стерильного газа, не содержащего кислорода; 5) микроорганизмы выращивают и поддерживают в герметически закрытых сосудах, в атмосфере бескислородного газа, часто под давлением для ис­ключения проникновения воздуха; 6) все шланги, по которым идут газы для продувки сосудов, должны быть из специальной ре­зины, со слабой степенью диффузии кислорода воздуха, или за­менены на металлические трубки; 7) все пересевы и добавки в среды проводят с помощью шприцев, продутых газом, не содер­жащим кислорода.

Степень поглощения кислорода и восстановленности среды оп­ределяется окислительно-восстановительным потенциалом Eh , ко­торый может быть измерен электрометрически на потенциометре или с помощью индикаторных красителей, например, резазурина, феносафранина, нейтрального красного и т. д., изменяющих ок­раску при изменении Eh . Особенно удобен резазурин, который добавляют к средам в концентрации 0,0001% и стерилизуют вме­сте с минеральными компонентами среды. В окисленной форме он окрашен в голубой цвет, при восстановлении цвет меняется на

слабо-розовый, полностью восстановленная форма бесцветна. Резазурин изменяет окраску при значениях ОВП, близких к —420 мВ, феносафранин — в области —252 мВ.

Для культивирования анаэробов предложены специальные камеры и система ГазПак (GasPak), образующая газы (водород и CO_2) в замкнутом пространстве и эффективно поглощающая кислород. В качестве поглотителя кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пирогаллола, дитионита натрия, металлическое железо и некоторые другие реактивы. При этом необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращивают микроорганизм. Например, на каждые 100 мл емкости используют 1 г пирогаллола и 10 мл 2,5 н. раствора гидроксида натрия. Поскольку многие анаэробы нуждаются в углекислоте, пирогаллол часто растворяют не в щелочи, а в насыщенном растворе бикарбоната натрия. Полноту поглощения кислорода контролируют раствором, содержащим окислительно-восстановительный индикатор. Для приготовления раствора смешивают равные объемы 0,024%-ного NaOH , 0,015%-ного водного метиленового синего и 6%-ной глюкозы; в качестве антисептика к раствору добавляют тимол. Перед использованием в пробирку наливают 5 мл смеси и нагревают на кипящей водяной бане до обесцвечивания, быстро охлаждают и помещают в анаэробную камеру. В анаэробных условиях раствор остается бесцветным.

В качестве восстановителя чаще всего используют сульфид и тиогликолат натрия. Обычно готовят 1%-ные растворы этих восстановителей в 5%-ном растворе бикарбоната натрия, стерилизуют автоклавированием и добавляют к средам сульфид натрия из расчета 250—500 мг/л, а тиогликолат — до 250 мг/л среды. Восстановители используют в концентрациях, не влияющих на рост микроорганизмов.

Для культивирования строгих анаэробов предложены специальные камеры, заполненные газовыми смесями (чаще всего 90% N_2 , 5% CO_2 и 5% H_2), которые содержат внутри все необходимое для выполнения микробиологических работ, включая термостат. Это оборудование сложно и дорого, но оно имеет одно неоспоримое преимущество — контакт клеток с кислородом воздуха остается минимальным почти на всех этапах работы.

4.2.3. Температура

Интервалы температур, в которых возможен рост различных микроорганизмов, заметно варьируются. У мезофилов, к которым относится большинство известных нам форм, температурный оптимум лежит в интервале от 25 до 37°. У термофилов он значительно выше — от 45 до 80—90°. Психрофилы хорошо развиваются в интервале температур 5—10°. Отклонения температуры от оптимальной неблагоприятно влияют на развитие микроорганизмов. Поэтому микроорганизмы выращивают в термостатах или

специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура. Мезофильные бактерии, естественным местом обитания которых являются вода и почва, выращивают в интервале от 20 до 30°, тогда как бактерии кожных покровов, слизистой или кишечника человека и животных культивируют при более высокой температуре — 35—37°.

Для выращивания психрофилов используют холодильные камеры.

4.2.4. Свет

Для роста подавляющего большинства микроорганизмов освещение не требуется. Напротив, прямые солнечные лучи отрицательно влияют на их развитие. Поэтому такие микроорганизмы выращивают в темноте. Свет необходим для роста фототрофных микроорганизмов. Однако естественное освещение используют редко, так как оно непостоянно и плохо контролируемо. Как правило, фототрофов выращивают в люминостатах, т. е. в камерах, освещенных лампами накаливания или флуоресцентными лампами дневного света. Необходимая температура в люминостатах создается благодаря вентиляции или холодильному устройству.

Выбор источника освещения определяется спектром его излучения и длинами волн, при которых осуществляют фотосинтез культивируемые микроорганизмы. Для выращивания пурпурных и зеленых бактерий лучше использовать лампы накаливания; для культивирования цианобактерий и микроводорослей можно применять флуоресцентные лампы дневного света. Помимо спектрального состава света обращают внимание на освещенность, которую измеряют с помощью люксметра.

4.2.5. Вода

Рост микроорганизмов невозможен без присутствия в окружающей среде воды, причем вода должна находиться в доступной для клетки форме, т. е. жидкой фазе. Однако в природных субстратах и питательных средах часть воды ассоциирована с молекулами растворенных веществ и не может быть использована микроорганизмами. Доступность воды в субстрате для роста микроорганизмов выражают величиной активности воды (a_w):

$$a_w = \frac{P}{P_0},$$

где P — давление пара раствора (мм рт. ст.); P_0 — давление пара чистой воды (мм рт. ст.) при данной температуре. Значение a_w для дистиллированной воды равно 1,00. При растворении различных веществ в воде эта величина уменьшается и соответственно падает доступность для клетки воды.

Микроорганизмы могут расти на средах со значением a_w от 0,99 до 0,63. Потребности в доступной воде у бактерий, как правило, выше, чем у дрожжей и мицелиальных грибов. Так, большинство бактерий, за исключением галофилов, хорошо растут на средах с величиной a_w от 0,99 до 0,95, минимальная величина a_w , обеспечивающая рост дрожжей, лежит в пределах от 0,91 до 0,88.

Активность воды в среде можно определить по формуле $a_w = A/100$, где A — относительная влажность (%) атмосферы, которую измеряют при равновесии в закрытом сосуде, содержащем среду. Различную активность воды в питательной среде или субстрате создают добавлением к ним таких соединений, как NaCl, KCl, глюкоза, глицерин, полиэтиленгликоль.

4.2.6. Периодическое и непрерывное культивирование

Существуют две принципиально разные системы выращивания микроорганизмов в жидкой среде. В одном случае после инокуляции среды не происходит ни добавления в нее, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы. Такая закрытая система культивирования носит название периодической и может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени, на протяжении которого меняется состав исходной среды и окружающие условия.

Непрерывное (проточное) культивирование в отличие от периодического характеризуется постоянной подачей питательной среды со скоростью, равной скорости удаления культуры. При этом объем культуры в ферментере во времени не меняется. Одно из основных условий непрерывного культивирования — хорошее перемешивание культуры в ферментере. Система непрерывного культивирования может быть реализована по принципу турбидостата или хемостата. Турбидостат — наиболее простой режим проточного культивирования, концентрация клеток в нем выбирается исследователем, а поступление питательных компонентов автоматически реализуется в соответствии с плотностью популяции. Меняя скорость подачи питательной среды («скорость разбавления»), экспериментатор может получать разные значения скорости роста популяции — от близких к нулю до максимальной, таким образом воспроизводя разные состояния культуры от стационарной фазы до стадии экспоненциального роста.

Для непрерывного культивирования микроорганизмов может быть использован слегка модифицированный ферментер, применяемый при периодическом культивировании (рис. 37). В первом случае требуется система двойного насоса (для добавления свежей среды и удаления культуральной жидкости), используемая вместе с регулятором уровня среды; при этом культуральная жидкость удаляется через отверстия для отбора проб. Такие насосы необходимы при проточном культивировании в больших емкостях. В малых ферментерах удаление жидкости может происхо-

дить через боковую отводную трубку, расположенную на уровне, позволяющем поддерживать определенный объем культуры. Малые ферментеры с боковым отводом жидкости можно изготовить из стандартных стеклянных или стальных сосудов.

4.3. ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Необходимым условием успешной работы с микроорганизмами является правильное поддержание их с целью сохранения не только жизнеспособности клеток, но и таксономических, а также любых других, важных для исследователя свойств. Общего метода, одинаково пригодного для хранения многочисленных и разнообразных групп микроорганизмов, пока не существует. Поэтому в крупных коллекциях разные группы микроорганизмов сохраняются различными методами. Кроме того, чтобы исключить возможность потери микроорганизма, каждый штамм сохраняется не одним, а несколькими способами.

К числу наиболее распространенных способов хранения микроорганизмов относятся периодические пересевы на свежие питательные среды, сохранение культур на питательной среде под вазелиновым маслом, хранение клеток в лиофилизированном состоянии. Значительно реже микроорганизмы сохраняют при низких или сверхнизких температурах, в дистиллированной воде или 1%-ном растворе хлористого натрия, на адсорбентах в высушенном состоянии. Выбор метода хранения во многом зависит от целей, для которых используются микроорганизмы, а также от имеющегося в распоряжении исследователя оборудования.

Периодические пересевы на питательные среды. Этот способ был одним из первых приемов длительного сохранения микроорганизмов в лабораторных условиях и до настоящего времени широко используется в практике микробиологических работ. Аэробные микроорганизмы пересевают чаще всего на поверхность скошенной агаризованной среды, микроаэрофилы — в полужидкую среду, содержащую 0,2—0,3% агара, анаэробы — в толщу плотной среды или в жидкую среду. Культуры пересевают на свежие среды в 2 пробирки (колбы). В дальнейшем из одной пробирки микроорганизмы используют для работы, культуру во второй пробирке оставляют для сохранения и последующего пересева.

Частота пересева на свежую среду различных микроорганизмов неодинакова и в большой степени определяется их свойствами. Многие микроорганизмы можно пересевать один раз в 1—2 месяца, хотя есть микроорганизмы, например молочнокислые бактерии, которые нуждаются в более частых пересевах. Допустимые сроки пересевов некоторых микроорганизмов приведены в Приложении. Хранение культур в холодильнике при 4—6° позволяет увеличить время между пересевами.

Поддержание культуры микроорганизмов регулярными пересевами имеет ряд существенных недостатков. Основной из них — возможная утрата некоторых морфологических и физиологичес-

ких признаков. Кроме того, частые пересевы нередко снижают биохимическую активность культур, повышают опасность инфицирования ее посторонними микроорганизмами. При частых пересевах, особенно на жидкие среды, велика вероятность возникновения спонтанных мутантов и их селекция.

Хранение под минеральным маслом. Хранение под минеральным маслом широко используется для бактерий и микроскопических грибов. Этот метод обеспечивает довольно длительное сохранение жизнеспособности и стабильности таксономических и других признаков у микроорганизмов различных систематических групп. Масло предотвращает высыхание среды, замедляет процессы метаболизма и позволяет увеличить время между пересевами.

Микроорганизмы выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде; аэробные микроорганизмы — на поверхности коротко скошенной (под углом 45°) среды, микроаэрофилы и факультативные анаэробы — в полужидкой среде, анаэробы — в толще среды (посев уколом или в расплавленную среду с перемешиванием). После того как культуры хорошо разовьются, их заливают маслом. Как правило, аспорогенные бактерии заливают через 2—7 суток после посева в зависимости от скорости роста микроорганизма, бациллы и актиномицеты — в стадии сформировавшихся покоящихся форм. Дрожжи рекомендуется заливать маслом через 4—10, мицелиальные грибы — через 7—12 суток.

Наиболее пригодно для заливки культур микроорганизмов высокоочищенное медицинское вазелиновое масло с плотностью 0,8—0,9. Предварительно масло стерилизуют 1 ч в автоклаве при 121° (1 ати), а затем для удаления влаги прогревают в течение 1 ч в сушильном шкафу при температуре не выше 150° или оставляют на двое—трое суток при комнатной температуре. Культуры заливают маслом так, чтобы слой его не превышал 1 см над средой или верхним краем скошенной среды, и сохраняют при комнатной температуре либо в холодильнике при $4-6^\circ$.

Для пересева клетки из-под масла отбирают петлей и, удалив излишек масла проведением петли по стенке пробирки, переносят на свежую питательную среду. Рекомендуется использовать среду того же состава, на которой культуру хранили. Многие микроорганизмы в первом пассаже после хранения под маслом развиваются медленнее, однако при последующих пересевах скорость роста их восстанавливается.

Метод хранения микроорганизмов под вазелиновым маслом прост, удобен в обращении, может быть использован в любой лаборатории. К недостаткам его можно отнести возможность инфицирования помещения микроорганизмами за счет разбрызгивания масла при обжигании петли, а также необходимость специальной очистки посуды от масла.

Хранение в лиофилизированном состоянии. Хранение лиофильно-высушенных клеток — широко распространенный метод длит-

тельного сохранения микроорганизмов. Лиофилизацией называют процесс высушивания под вакуумом замороженных клеток. Лиофильно-высушенные клетки сохраняют в ампулах, запаиваемых под вакуумом. Применение этого метода позволяет в течение 10—20 и более лет сохранить без заметных изменений жизнеспособность, морфологические, культуральные, физиологические свойства, а также биохимическую активность клеток.

Микроорганизмы, подлежащие лиофилизации, выращивают в оптимальных условиях до начала стационарной фазы роста или окончания формирования покоящихся форм. Затем клетки или соответственно покоящиеся формы суспендируют в специальных жидкостях, получивших название защитных сред. В состав защитных сред входят различные вещества, которые предохраняют клетки от повреждений в период замораживания и высушивания. Ниже приведены рецепты некоторых защитных сред, используемых для лиофилизации клеток различных микроорганизмов:

- | | |
|------------------------|-----------|
| 1. Желатина | — 1 г; |
| сахароза | — 10 г; |
| вода дистиллированная | — 100 мл. |
| 2. Молоко обезжиренное | — 100 мл; |
| глюкоза | — 7 г. |
| 3. Молоко обезжиренное | — 100 мл; |
| NH ₄ Cl | — 0,5 г; |
| аскорбиновая кислота | — 0,5 г; |
| тиомочевина | — 0,5 г. |
| 4. Лошадиная сыворотка | — 75 мл; |
| мясной бульон | — 25 мл; |
| глюкоза | — 7,5 г. |

Для успешной лиофилизации плотность в защитной среде должна быть как можно более высокой — 10^9 — 10^{10} клеток в 1 мл. Полученную суспензию разливают в ампулы из нейтрального стекла по 0,5—1,0 мл, замораживают при температуре от -20 до -70° , затем высушивают и запаивают под вакуумом. Остаточная влажность лиофилизированных клеток колеблется от 1 до 6% и определяется составом защитной среды и режимом высушивания. В различных лабораториях режимы замораживания и высушивания заметно варьируются и во многом зависят от имеющегося оборудования. Ампулы с лиофильно-высушенными клетками рекомендуется сохранять в темноте при температуре 4 — 6° . Хранение при более высокой температуре, особенно превышающей 25 — 30° , заметно снижает выживаемость клеток.

Для реактивации к лиофилизированным клеткам добавляют по каплям стерильную дистиллированную или водопроводную воду в количестве 0,5—1,0 мл. После регидратации клетки высевают на богатые питательные среды.

Лиофилизацию широко применяют для длительного хранения различных микроорганизмов. Тем не менее этот метод нельзя

считать универсальным. Следует отметить, что к лиофилизации более устойчивы грамположительные, чем грамотрицательные бактерии. Очень плохо переносят ее фототрофные и хемолитотрофные бактерии, микоплазмы, многие облигатные анаэробы. Выживаемость спор после лиофилизации заметно выше, чем вегетативных клеток. Дрожжи с мелкими клетками и аскоспорами родов *Pichia* и *Hansenula* выдерживают лиофилизацию лучше, чем слабоспорулирующие или неспорулирующие крупные клетки дрожжей родов *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*.

Хранение при низких и сверхнизких температурах. Хранение микроорганизмов в замороженном состоянии при низких и сверхнизких температурах по сравнению с другими методами характеризуется наибольшей универсальностью. Однако этот метод требует специального оборудования и большой осторожности в работе с жидким азотом, поэтому используется лишь для сохранения микроорганизмов, не выдерживающих лиофилизацию.

Клетки замораживают при разных температурах (от -10 до -196°) и различных скоростях замораживания. Для защиты от повреждающего действия низких температур клетки предварительно суспендируют в растворах криопротекторов. Чаще других применяют 10—20%-ный раствор глицерина, 7—10%-ный раствор диметилсульфоксида



вор сахарозы. Суспензию клеток с высокой плотностью (10^9 — 10^{10} клеток в 1 мл) разливают в ампулы или флаконы с завинчивающейся крышкой. Ампулы запаивают и помещают в холодильник с температурой -70° , а затем переносят в жидкий азот, где и сохраняют при -196° . Оттаивание замороженных клеток должно быть как можно более быстрым. Поэтому ампулы погружают на 2 мин в водяную баню с температурой 35 — 45° . Клетки из ампул высеивают на богатые питательные среды.

При температуре хранения от -20 до -40° хорошо выживают немногие микроорганизмы; значительно эффективнее хранение при -70° в твердой углекислоте и особенно в условиях сверхнизких температур: при -196° (жидкий азот) или при -210° (газовая фаза жидкого азота).

Хранение в глицероле. Одним из самых удобных методов хранения микроорганизмов является их содержание при низких температурах (-20°) в растворах глицерола, который служит криопротектором. Данный способ широко распространен, однако не все микроорганизмы выдерживают такую обработку. Поэтому считается, что для клеток, подвергаемых замораживанию в глицероле, необходимы предварительные эксперименты по определению степени выживаемости их. Наибольшее распространение этот способ консервации микроорганизмов получил при хранении суспензий различных спор.

Для проведения экспериментов по хранению готовят 50%-ный раствор глицерола в дистиллированной воде и стерилизуют его при 1 ати в течение 30 мин. Клетки из выросших культур (обычно из середины экспоненциальной фазы роста), предназначенные для хранения, смешивают в пропорции 1:1 с 50%-ным глицеролом, перемешивают и ставят в морозильник. Хранить суспензии удобно в стерильных пробирках Эппендорф, а для их приготовления использовать автоматические пипетки со стерильными наконечниками и готовить смеси в ламинарном шкафу. Из сохраняемых клеток периодически (2—6 раз в год) отбирают пробы для проверки на выживаемость. В зависимости от результатов проверки рассчитывают схемы консервации той или иной культуры и периодичности их пересева.

Для культур микроорганизмов с твердых сред перед смешиванием с глицеролом готовят суспензии в жидкой среде или в оптимальном для хранения буферном растворе (проверяется экспериментально). Можно также суспендировать клетки с твердых сред непосредственно в 25%-ном стерильном глицероле.

Хранение в дистиллированной воде или 1%-ном растворе хлорида натрия. Хранение микроорганизмов в дистиллированной воде или в 1%-ном растворе NaCl не требует специального оборудования и доступно любому экспериментатору. Допустимые сроки хранения некоторых микроорганизмов этими методами приведены в табл. 8.

Микроорганизмы предварительно выращивают в оптимальных условиях, после чего клетки суспендируют в дистиллированной воде или 1%-ном растворе хлорида натрия. Успешному сохранению клеток способствует высокая плотность суспензии — не менее 10^8 — 10^9 клеток в 1 мл. Суспензию разливают в стерильные пробирки или флаконы и сохраняют в холодильнике или при комнатной температуре. Оставлять на хранение рекомендуется клетки начала стационарной фазы роста культуры или сформировавшиеся покоящиеся формы — споры, цисты.

Таблица 8

Допустимые сроки хранения (месяцы)
микроорганизмов в дистиллированной воде
и 1%-ном растворе NaCl

Микроорганизмы	Дистилли- рованная вода*	1 %-ный раствор NaCl
<i>Achromobacter liquefaciens</i>	6	6
<i>Escherichia coli</i>	12	12
<i>Gluconobacter oxydans</i>	12	6
<i>Bacillus subtilis</i>	12	12
<i>Micrococcus aurantiacus</i>	12	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6
<i>Micrococcus luteus</i>	6	6
<i>Serratia marcescens</i>	12	12

* Микроорганизмы сохраняют в холодильнике при 4—6 °С.

Хранение в высушенном состоянии на адсорбентах. Этот метод применяют главным образом для актиномицетов, микроскопических грибов и анаэробных бактерий, образующих споры. В качестве адсорбентов используют почву, кварцевый песок, силикагель, вату, фильтровальную бумагу. Разработанной стандартной техники этот способ не имеет. В самом общем виде он сводится к тому, что стерильный адсорбент, помещенный в ампулы, смешивают с густой суспензией клеток и высушивают под вакуумом или при комнатной температуре. Затем ампулы запаивают и хранят при комнатной температуре или в холодильнике. Имеются данные, что у актиномицетов после хранения в почве или в кварцевом песке восстанавливаются некоторые таксономические признаки (окраска воздушного и субстратного мицелия), которые были утрачены в процессе длительного культивирования в лаборатории.

Оценка жизнеспособности микроорганизмов после длительного хранения. Жизнеспособность микроорганизмов после различных сроков хранения определяют путем посева их на богатые питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Процент выживаемости микроорганизмов определяют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиологию, биохимические свойства, циклы развития микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистыми культурами. Чистой, или аксенической, культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Умение выделить микроорганизмы одного вида из смешанной популяции, существующей в природе, и поддерживать чистоту культуры — необходимое условие работы с микроорганизмами. Выделение чистой культуры обычно включает три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры.

5.1. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Накопительной называют такую культуру, в которой преобладают представители одной физиологической группы или даже одного вида микроорганизмов. Метод накопительных культур был введен в практику микробиологических исследований С. Н. Виноградским и М. Бейеринком. Сущность его заключается в создании селективных, т. е. избирательных условий, которые обеспечивают преимущественное развитие желаемых микроорганизмов или группы микроорганизмов из смешанной популяции.

При создании селективных условий необходимо знать физиологию или четко представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Селективные условия создают чаще всего, подбирая соответствующие среды, поскольку различные микроорганизмы для своего развития предъявляют неодинаковые требования к источникам питания. Например, микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот, могут расти в среде, из состава которой исключены связанные формы азота. Если внести в такую среду почву, то из громадного разнообразия имеющихся в ней микроорганизмов в первую очередь будут развиваться азотфиксаторы. Накопительные культуры автотрофных микроорганизмов получают на средах, где единственным источником углерода служит углекислота. Отсутствие в среде других соединений углерода задерживает развитие гетеротрофов. Такие специфические питательные среды, удовлетворяющие потребности преимущественно одной группы микроорганизмов, носят название селективных. В зарубежной литературе большее распространение получили термины «накопительные» или «селективные» среды.

Накопительные культуры микроорганизмов, обладающих высокой требовательностью к составу питательных сред, получают иначе. При их выделении используется неодинаковая чувствительность клеток смешанной популяции к продуктам обмена веществ, накапливающимся в среде. Примером могут служить молочнокислые бактерии, для накопления которых используют солодовое сусло без мела, т. е. среду, первоначально не обладающую селективностью. После внесения природного материала, содержащего молочнокислые бактерии, в среду вначале наряду с молочнокислыми бактериями хорошо развиваются представители родов *Enterobacter* и *Escherichia*. Однако по мере накопления в среде молочной кислоты и этилового спирта, образуемого гетероферментативными видами, условия для развития энтеробактерий и эшерихий постепенно ухудшаются, тогда как молочнокислые бактерии, которым свойственна высокая кислото- и спиртоустойчивость, продолжают расти. Таким образом, в результате развития молочнокислых бактерий среда приобретает необходимую степень селективности, что и обеспечивает получение накопительной культуры этих бактерий. Другим примером могут служить уксуснокислые бактерии, которые характеризуются высокой устойчивостью к этиловому спирту. Накопление этих бактерий осуществляют на сусле, к которому добавляют 4—5% этанола.

Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций в среду включают антибиотики, которые отличаются специфичностью действия и позволяют избирательно подавить рост определенной группы микроорганизмов. Так, селективные условия для развития грамотрицательных бактерий можно создавать внесением в среду пенициллина в концентрации от 0,2 до 100 мг/л, поскольку многие виды грамположительных бактерий при этом или совсем не развиваются, или развиваются медленно. Чтобы создать благоприятные условия для развития бактерий и, напротив, подавить рост мицелиальных грибов, к средам рекомендуют добавлять нистатин в концентрации от 0,1 до 20 мг/л или гризеофульвин в концентрации от 1 до 20 мг/л.

При создании селективных условий следует учитывать неодинаковое отношение различных микроорганизмов к аэрации, температуре, кислотности среды и т. д. Поэтому при получении накопительной культуры аэробных микроорганизмов обеспечивают большую поверхность контакта среды с воздухом, а для обогащения среды анаэробными микроорганизмами тем или иным способом создают анаэробные условия. Культивирование при высокой температуре (50° и выше) исключает развитие мезофильных микроорганизмов и обеспечивает рост термофилов. Селективным фактором может служить также неодинаковая скорость роста различных микроорганизмов при данной температуре. Например, на минеральной среде при освещении и температуре 35° удается почти полностью подавить рост зеленых водорослей и получить культуру, обогащенную цианобактериями.

При получении накопительных культур следует учитывать и такие особенности микроорганизмов, как способность к образованию эндоспор. Для накопления спорообразующих бактерий среды инокулируют, как правило, субстратом, который предварительно пастеризуют, т. е. кратковременно прогревают при высокой температуре (10 мин при 75° или 2—5 мин при 80°). Таким образом можно полностью или почти полностью исключить развитие бактерий, не образующих споры.

Следует иметь в виду, что элективные условия далеко не всегда оптимальны для роста выделяемых микроорганизмов, однако они лучше переносятся ими, чем сопутствующими формами.

О получении накопительной культуры судят по появлению характерных признаков развития выделяемых микроорганизмов — помутнение среды, иногда сопровождаемое пигментацией, появление пленки, осадка, выделение газов. Помимо визуального наблюдения накопительную культуру микроскопируют и выявляют присутствие желаемых форм. Иногда необходимо определить продукты метаболизма, образование которых свойственно выделяемым микроорганизмам. Например, о развитии нитрифицирующих бактерий свидетельствует появление в среде нитрит- и нитрат-ионов и уменьшение или даже полное исчезновение иона аммония.

Основные условия элективности, позволяющие получить накопительные культуры микроорганизмов с разным типом обмена веществ, суммированы в табл. 9.

5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

После того как получена накопительная, приступают к выделению чистой культуры. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или одной клетки.

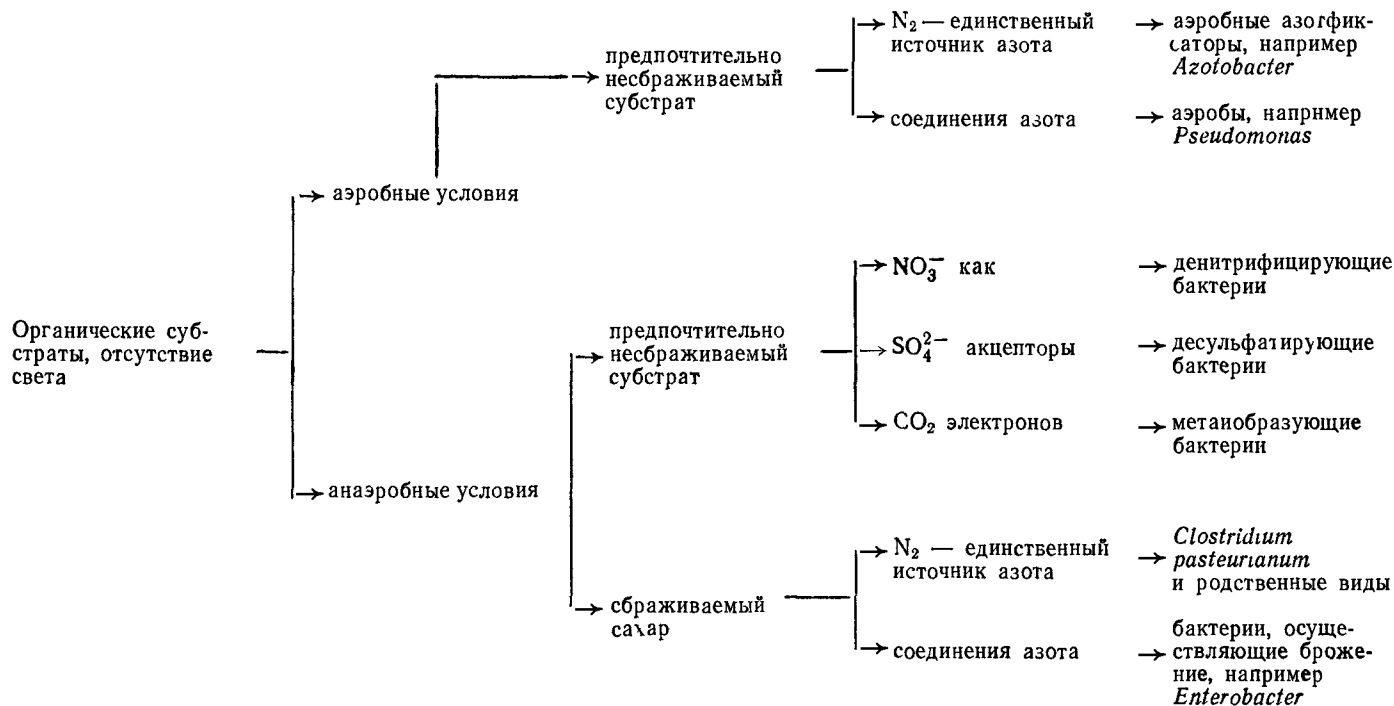
5.2.1. Выделение чистой культуры из отдельной колонии

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Однако этот метод неприменим для выделения микроорганизмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. К числу таких микроорганизмов относятся некоторые бактерии, многие водоросли и простейшие.

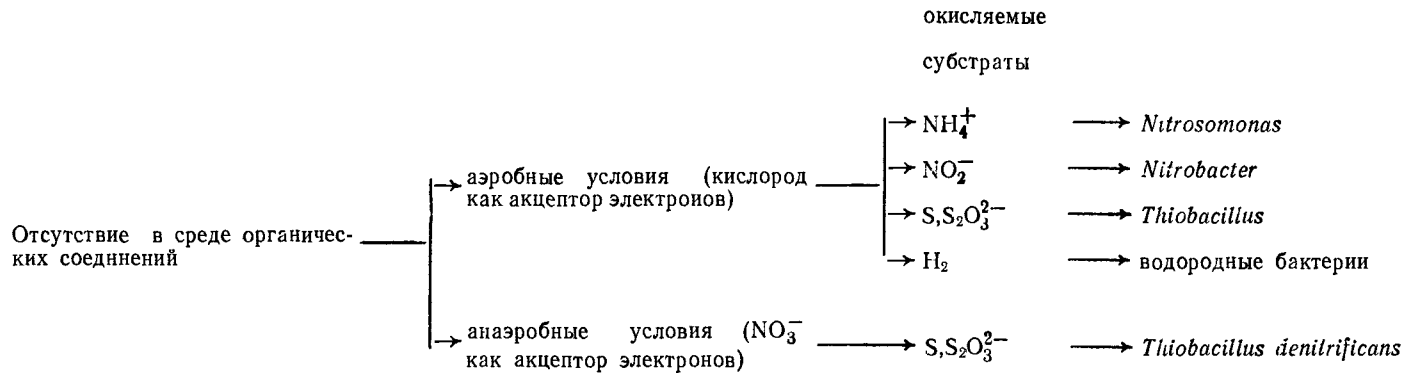
При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов накопительную культуру высевают на поверхность плотной среды. Порядок работы следующий. Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар или желатину, разливают в стерильные чашки Петри. После того как среда застынет, на ее поверхность из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю сначала по одной половине поверхности среды в чашке Петри,

Основные факторы, определяющие получение накопительных культур некоторых групп бактерий (по Стейниеру Р. и др., 1979)

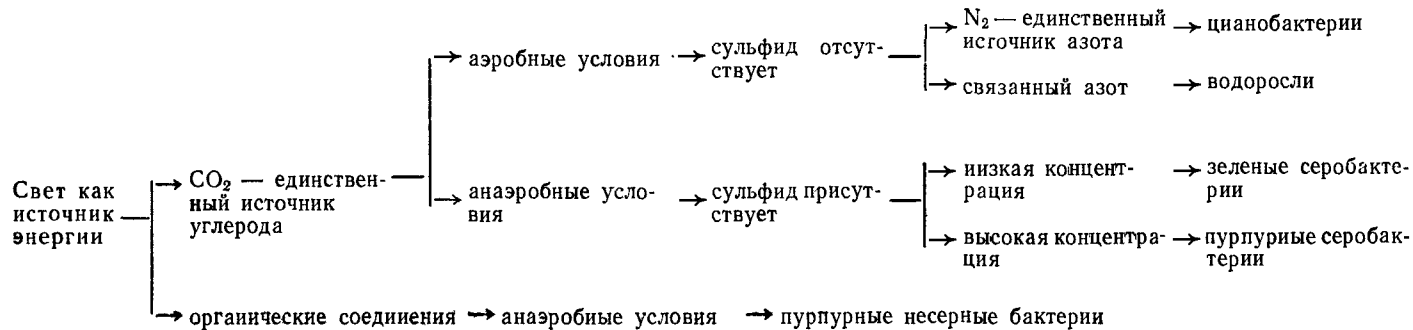
Хемогетеротрофные бактерии



Хемоавтотрофные бактерии



Фототрофные микроорганизмы



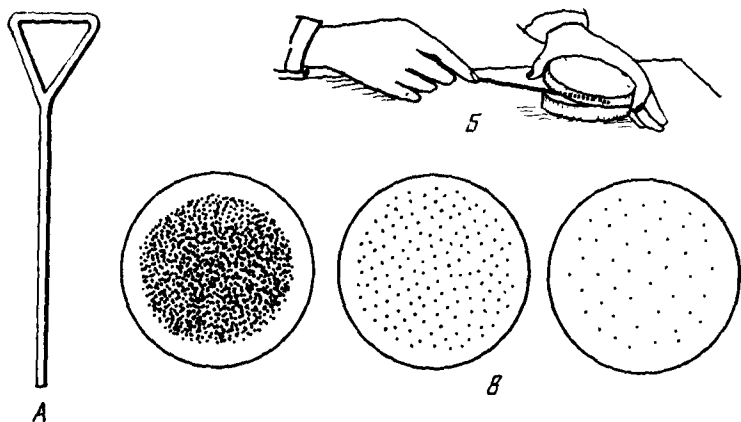


Рис 40. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем:
 А — шпатель Дригальского; Б — рассев; В — рост микроорганизмов после посева

затем по второй половине, после чего этим же шпателем протирают поверхность плотной среды последовательно во 2-й, 3-й и 4-й чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдают сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих — изолированные колонии (рис. 40). Рассевать накопительную культуру можно петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рис. 41. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизуют в пламени горелки.

После посева чашки помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки Петри при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 1—7 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов. Вырос-

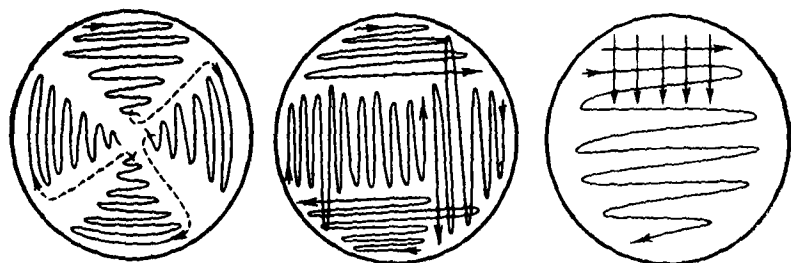


Рис. 41. Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды петлей

шие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирки или в жидкую среду.

Изолированные колонии аэротолерантных микроорганизмов и факультативных анаэробов чаще получают методом глубинного посева. Для этого плотную питательную среду предварительно разливают в пробирки по 15—20 мл и стерилизуют. Непосредственно перед посевом пробирки помещают в кипящую водяную баню, чтобы среда расплавилась. Высев проводят из разведений накопительной культуры в стерильной водопроводной воде. Разведения готовят с таким расчетом, чтобы при высеве 0,5—1,0 мл разведения получить изолированные колонии. Степень разведения определяется плотностью накопительной культуры. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений. Для этого в пробирку с расплавленной и остуженной до 48—50° агаризованной средой вносят 0,5—1,0 мл одного из разведений накопительной культуры. Посевной материал тщательно перемешивают, вращая пробирку между ладонями. Затем около пламени горелки вынимают из пробирки пробку, обжигая края пробирки в пламени горелки, и быстро выливают содержимое пробирки в чашку Петри. После того как агаризованная среда застынет, чашки Петри помещают в термостат. Колонии, выросшие в толще среды, вырезают стерильным скальпелем или извлекают стерильными капиллярными трубками или просто петлей и переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов.

Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев проводят на поверхность среды в чашки Петри, но после посева чашки тотчас помещают в анаэроstat. Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведения накопительной культуры проводят в расплавленной и охлажденной до 45—50° агаризованной питательной среде. Делают 6—10 последовательных разведений. Затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем стерильной смеси парафина и вазелинового масла (соотношение 3:1), что препятствует проникновению воздуха в толщу агаризованной среды.

Иногда агаризованную питательную среду после посева и тщательного перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри. Можно использовать капиллярные пипетки Пастера, в которые набирают соответствующее разведение накопительной культуры в расплавленной агаризованной питательной среде. Конец капилляра запаивают. При удачно выбранном разведении накопительной культуры в одной из пробирок (пипеток Пастера, трубок Бурри) вырастают изолированные колонии. Чтобы извлечь образовавши-

еся колонии, поступают следующим образом. Удаляют стерильной иглой слой парафина и вазелинового масла, а столбик агаризованной среды осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская газ, не содержащий кислорода, через капилляр, который помещают между стенкой пробирки и агаризованной средой. Агаризованную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

Иногда плотную среду из пробирки извлекают иначе. Пробирку слегка нагревают, все время быстро вращая ее над пламенем горелки. При этом агар, непосредственно прилегающий к стенке, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика легко выскальзывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным ланцетом и извлекают колонии, захватывая их стерильными капиллярными трубками или петлей. Можно также вырезать их стерильным ланцетом. Извлеченные колонии

переносят в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов. Если изолированные колонии получены в капилляре, то после тщательной дезинфекции поверхности его разламывают стерильным пинцетом и участки капилляра, содержащие изолированные колонии, переносят в стерильную среду.

Для получения изолированных колоний методом глубинного посева и методом разведений рекомендуется использовать осветленные питательные среды.

Когда хотят получить изолированные колонии облигатных анаэробных бактерий, характеризующихся особенно высокой чувствительностью к кислороду (экстремальные анаэробы), используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Сущность этого метода заключается в следующем. Расплавленную агаризованную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку. Агаризованная среда при этом равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя агаризованной среды в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом (рис. 42).

В некоторых случаях бывает достаточно одного посева в плотную среду, чтобы получить чистую культуру. Однако чаще посев в плотную питательную среду повторяют 2—3 раза. В каче-

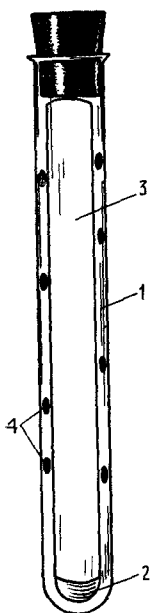


Рис. 42. Изолированные колонии облигатных анаэробов в пробирках, заполненных газом (по Хангейту):

1 — агаризованная питательная среда; 2 — конденсационная вода; 3 — смесь газов H_2 и CO_2 ; 4 — колонии бактерий

стве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельной колонии.

5.2.2. Выделение чистой культуры из одной клетки

Чистую культуру из одной клетки можно выделить капельным методом, с помощью микроманипулятора или микроселектора.

Капельный метод Линднера используют при работе с крупными микроорганизмами: дрожжами, мицелиальными грибами, водорослями. Порядок работы следующий. Накопительную культуру разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Затем на поверхность стерильного покровного стекла стерильным стальным пером наносят ряд капель приготовленного разведения. Готовят препарат «висячая капля». Нанесенные на покровное стекло капли просматривают под микроскопом и отмечают те, в которых обнаружена только одна клетка. После этого препарат помещают в термостат во влажную камеру, которой обычно служит чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне. Через 12—24 ч отмеченные капли вновь микроскопируют. Те капли, в которых наблюдается образование микроколоний, осторожно снимают с покровного стекла кусочками стерильной фильтровальной бумаги и переносят в пробирки со стерильной средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора.

Микроманипулятор — прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. Микроманипулятор имеет два операционных штатива, между которыми расположен обычный микроскоп. На предметном столике микроскопа установлена влажная камера, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закреплены микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Микропипетки вводят во влажную камеру таким образом, чтобы их концы оказались в висячей капле. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой.

Выделение отдельных клеток с помощью микроселектора Перфильева. Наиболее существенной частью микроселектора Перфильева является стеклянный микрокапилляр, имеющий строго прямоугольное сечение. Благодаря этому канал капилляра хорошо просматривается даже с иммерсионным объективом. Стерильный капилляр заполняют исследуемой суспензией клеток в агаризованной питательной среде и при большом увеличении микроскопа находят участок с одной клеткой. Специальным приспособлением этот участок капилляра стерильно выбивают в приемник, из которого затем переносят в стерильную среду. Микроселектор

Перфильева можно использовать для выделения как крупных, так и мелких микроорганизмов.

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ ВЫДЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРЫ

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. Это осуществляется обычно несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена. Такой контроль возможен только для культур, способных расти на поверхности плотных сред.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать под микроскопом. Для этого следует приготовить препарат фиксированных окрашенных клеток и просмотреть его с иммерсионной системой или препарат живых клеток и просмотреть его, используя фазово-контрастное устройство. Чистая культура многих микроорганизмов, как правило, морфологически однородна; допустимо лишь незначительное варьирование размеров клеток. Однако необходимо помнить, что клетки некоторых бактерий, например, микобактерий, нокардий и др., очень полиморфны, поэтому определение чистоты таких культур при микроскопировании вызывает некоторые затруднения. Чистоту культур микроорганизмов обязательно проверяют высевом на питательные среды. Прежде всего выделенную культуру высевают на питательную среду, благоприятную для ее роста. Однородность выросших колоний — свидетельство чистоты культуры. Обязателен посев на мясо-пептонный агар — среду, которая обеспечивает рост многих хемогетеротрофов. Критерием чистоты культуры является однородность выросших колоний или отсутствие роста, если данные микроорганизмы на мясо-пептонном агаре не развиваются. Следует иметь в виду, что заключение о чистоте некоторых культур микроорганизмов нельзя сделать только по результатам посева на МПА. Особенно это касается автотрофных микроорганизмов, а также представителей гетеротрофов, склонных развиваться с одним или несколькими спутниками. Чистоту таких культур микроорганизмов проверяют высевом еще на ряд сред — сусло, мясо-пептонный бульон, картофельный агар и др. Набор сред и их состав определяются особенностями метаболизма выделенных микроорганизмов, а также их возможных спутников.

МОРФОЛОГИЯ И ЦИТОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1. МИКРОСКОПИЯ

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величина которых измеряется в большинстве случаев микрометрами ($\text{мкм} = 0,001 \text{ мм} = 10^{-6} \text{ м}$), возможно только с помощью микроскопов, обеспечивающих увеличение исследуемых объектов в сотни (световая микроскопия) и десятки тысяч (электронная микроскопия) раз. Изображение в световом микроскопе формируется вследствие того, что объект и различные элементы его структуры избирательно поглощают свет с различной длиной волны (абсорбционный контраст) или вследствие изменения фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст). Световая микроскопия включает обычную просвечивающую микроскопию (светло- и темнопольную), фазово-контрастную и люминесцентную.

6.1.1. Светлопольная микроскопия

Существуют различные модели учебных и исследовательских световых микроскопов. Внешний вид и принципиальное устройство одного из них (микроскоп биологический рабочий, МБР-1) приведены на рисунке 43. Подобные микроскопы позволяют определить форму клеток микроорганизмов, их размер, подвижность, степень морфологической гетерогенности, а также характерную для микроорганизмов способность к дифференцирующему окрашиванию. Рассмотрим некоторые особенности оптической системы светового микроскопа на примере МБР-1, так как от знания их зависит успех наблюдения объекта и надежность получаемых результатов.

Оптическая часть микроскопа включает осветительный аппарат, объектив и окуляр.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора и предназначен для наилучшего освещения препарата. Регулируемое зеркало укреплено у основания штатива и имеет две стороны: вогнутую и плоскую. Вогнутое зеркало собирает и концентрирует в плоскости препарата пучок лучей, идущих от источника света, поэтому им пользуются только в тех случаях, когда работают без конденсора, т. е. с очень малыми увеличениями. При работе с конденсором, который рассчитан на использование

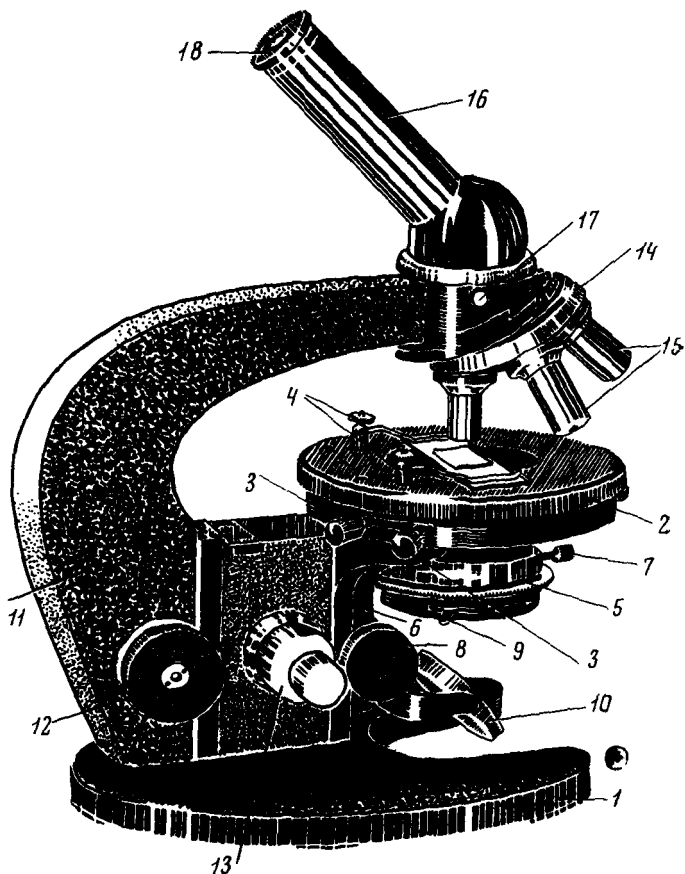


Рис. 43. Микроскоп МБР-1:

1 — подковообразное основание микроскопа; 2 — предметный столик; 3 — винты для перемещения предметного столика; 4 — клеммы, прижимающие препарат; 5 — конденсор; 6 — крошечный конденсор; 7 — винт, укрепляющий конденсор в гильзе; 8 — рукоятка перемещения конденсора; 9 — рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10 — зеркало; 11 — тубусодержатель; 12 — рукоятка макрометрического винта; 13 — рукоятка микрометрического винта; 14 — револьвер; 15 — объективы; 16 — наклонный тубус; 17 — винт для крепления тубуса; 18 — окуляр

параллельных лучей, следует пользоваться только плоской стороной зеркала. Конденсор, укрепленный непосредственно над зеркалом, состоит из нескольких линз и предназначен для собирания параллельных лучей света, идущих от источника света и отраженных плоским зеркалом, в одной точке — фокусе, который должен находиться в плоскости препарата. В конденсор вмонтирована ирисовая (апертурная) диафрагма, позволяющая задерживать из-

лишние лучи света и регулировать апертуру (см. ниже) конденсора. Под конденсором находится откидная оправа для светофильтра.

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он дает действительное увеличенное и обратное изображение изучаемого объекта. Объектив состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Самая главная — наружная (фронтальная) линза, от фокусного расстояния которой зависит увеличение объектива. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Увеличение объектива всегда обозначено на его оправе. От увеличения объектива зависят еще две его характеристики — рабочее расстояние, т. е. расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата при сфокусированном объекте, и площадь поля зрения. Чем больше увеличение объектива, тем меньше его рабочее расстояние и поле зрения (табл. 10).

Таблица 10

Оптические данные объективов микроскопа МБР-1

Система	Собственное увеличение	Числовая апертура	Фокусное расстояние, мм	Свободное рабочее расстояние, мм
Сухая	8×	0,20	18,2	8,53
Сухая	40×	0,65	4,3	0,40
Масляная иммерсия	90×	1,25	1,9	0,10

Микроскопы имеют сухие объективы для наблюдения живых микроорганизмов, а также для поиска нужного поля зрения, дающие увеличение в 8 (10) и 40 раз, и иммерсионные, увеличивающие объект в 90 (100 раз) и позволяющие провести более детальное изучение формы и строения микроорганизмов.

Окуляр содержит две линзы — глазную (верхнюю) и собирающую и служит для рассмотрения изображения предмета, даваемого объективом, т. е. выполняют роль лупы. Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе, например 15×. Общее увеличение окуляра повышается с уменьшением фокусного расстояния линз, его составляющих, поэтому более сильные окуляры будут короткими, а более слабые — длинными.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра. Так, например, использование окуляра 15× и объектива 90× позволяет увеличить объект в 1350 раз. Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким.

Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, которая зависит от длины волны используемого света и числовой апертуры оптической системы микроскопа. Разрешающая способность связана обратной связью с пределом разрешения — минимальным расстоянием между двумя точками, при котором еще можно различить каждую из них. Предел разрешения определяется следующим образом:

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2},$$

где d — минимальное расстояние между двумя точками; A_1 — числовая апертура объектива; A_2 — числовая апертура конденсора; λ — длина волны используемого света. Числовая апертура определяется произведением синуса половины (u) отверстного угла (α) на показатель преломления (n) среды, граничащей с линзой (рис. 44): $A = n \cdot \sin u$. Иными словами, числовая апертура — это оптический «охват» линзы, она является мерой количества света, попадающего в линзу. Использование объективов с большой апертурой и коротковолнового света позволяет увидеть структурную организацию клетки и даже крупные вирусы.

Числовая апертура любой линзы, граничащей с воздухом, не может быть больше 1, так как показатель преломления воздуха равен 1, а угол u (см. рис. 44) не может быть больше 90° (т. е. $\sin u \leq 1$). В микроскопе МБР-1 объектив $40\times$ имеет апертуру 0,65, а конденсор — примерно 1. Таким образом, при использовании объектива $40\times$ и зеленого света с длиной волны 550 нм (0,55 мкм) предел разрешения составляет 0,33 мкм. Повысить разрешающую способность можно двумя путями: либо освещать объект более короткими лучами света, например ультрафиолетом, что требует применения дорогостоящей кварцевой оптики, либо увеличивать показатель преломления среды, граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла,

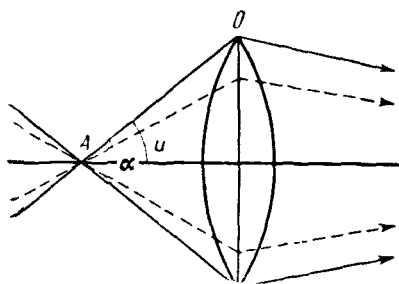


Рис. 44. Схема хода лучей при разной величине угла α :
 A — объект; O — объектив; α — от-
 верстный угол; u — половина отвер-
 стного угла

на котором находится объект (n стекла = 1,5). Для этого между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом помещают каплю жидкости с показателем преломления большим, чем показатель преломления воздуха, например, каплю воды ($n = 1,3$), глицерина ($n = 1,4$) или кедрового (иммерсионного) масла ($n = 1,5$). Для каждой указанной жидкости выпускают специальные объективы, которые называются иммерсионными. Числовая апертура этих объекти-

вов возрастает благодаря увеличению как значения n , так и $\sin u$ (рис. 45).

Числовая апертура объектива указана на его оправе. Объективы микроскопа МБР = 18 \times и 40 \times имеют апертуру соответственно 0,20 и 0,65. У масляного иммерсионного объектива с увеличением 90 \times апертура 1,25. На оправе этого объектива нанесено также обозначение «МИ» — масляная иммерсия — и черное кольцо. На оправе объектива водной иммерсии имеется обозначение «ВИ» — водная иммерсия — и белое кольцо. Этот объектив увеличивает в 70 раз (70 \times) и имеет апертуру 1,23.

Апертура конденсора должна соответствовать числовой апертуре объектива. Когда она меньше апертуры объектива, оптические возможности линзы последнего не будут использованы полностью из-за слабости попадающего в нее светового потока. Если апертура конденсора больше апертуры объектива (что, в частности, бывает при работе с сухими системами), то необходимо несколько прикрыть ирисовую диафрагму конденсора. Это приведет к устранению рассеянного света и даст нужную контрастность изображения (рис. 46). Неиммергированный конденсор микроскопа

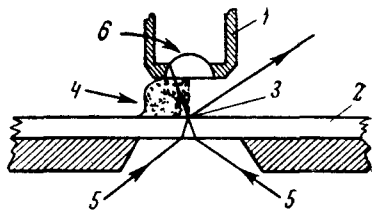


Рис. 45. Влияние иммерсионного масла на ход лучей в микроскопе: 1 — объектив; 2 — предметное стекло; 3 — объект; 4 — иммерсионное масло; 5 — лучи света; 6 — фронтальная линза объектива

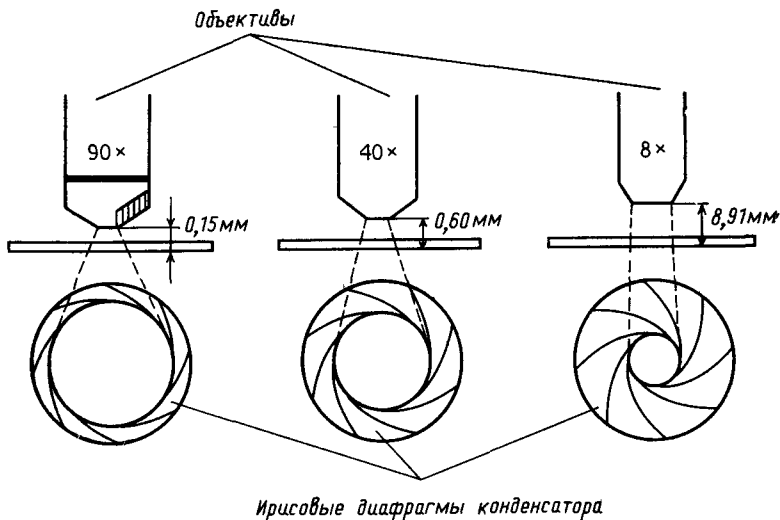


Рис. 46. Соотношение между увеличением объектива, рабочим расстоянием объектива и степенью раскрытия ирисовой диафрагмы конденсора

МБР-1 имеет апертуру не более 0,95. Помещая иммерсионное масло между верхней линзой конденсора и нижней поверхностью предметного стекла, повышают апертуру конденсора до 1,2.

В работе со световым микроскопом следует помнить, что четкое изображение получается при хорошем освещении; однако дифрагмирование конденсора дает эффект контрастирования живых объектов. Препарат должен быть частью однородной оптической системы, что достигается заливкой объекта водой, маслом или другой подходящей жидкостью. В случае необходимости наблюдения объекта через дно чашки Петри лучше использовать вогнутое зеркало, устраняя эффекты искажения, вызванные неровностью поверхности чашки, с помощью капли иммерсионного масла, накрытой покровным стеклом.

ПОРЯДОК РАБОТЫ СО СВЕТОПОЛЬНЫМ МИКРОСКОПОМ

Установка света по Кёлеру. Хорошие результаты при работе с микроскопом могут быть получены только при условии правильного освещения объекта. Лучший способ освещения основан на системе Кёлера. Установку света выполняют в такой последовательности.

1. Предварительная подготовка. Устанавливают микроскоп и осветитель на крестовину, что обеспечивает необходимое расстояние между источником света и зеркалом микроскопа. На предметный столик помещают препарат. Устанавливают объектив $8\times$. Поднимают конденсор вверх до упора. Открывают полностью диафрагму конденсора. Отодвигают матовое стекло. Ставят плоское зеркало. Закрывают диафрагму осветителя, оставив только небольшое отверстие.

2. Включают осветитель. Пользуясь реостатом, регулируют яркость света таким образом, чтобы нить лампы давала слабый накал (иначе можно повредить глаза!). Корпусу осветителя придают такое положение, при котором свет падал бы в центр зеркала.

3. Закрывают зеркало микроскопа кружком белой бумаги и фокусируют на него изображение витка нити лампы осветителя. Это достигается передвижением патрона лампы осветителя.

4. Глядя в окуляр и слегка вращая зеркало, ловят в поле зрения изображение краев диафрагмы осветителя, которое будет иметь вид светлого пятна с нечеткими краями. Величина пятна зависит от степени раскрытия диафрагмы и положения объектива. Чем больше отверстие диафрагмы и чем выше объектив, тем больше пятно. Если оно занимает значительную часть поля зрения, его уменьшают, несколько опустив объектив или сузив отверстие диафрагмы осветителя, глядя при этом в окуляр. В тех случаях, когда пятно сдвинуто к краю поля зрения, его переводят в центр осторожным поворотом зеркала. По ряду причин (отсутствие идеального точечного источника света, абберация) под микроскопом чаще всего видно не одно пятно, а несколько четких пятен. Уста-

новку света осуществляют по центральному пятну. В случае образования по краям диафрагмы осветителя цветной бахромы центрируют конденсор, смещая его регулировочными ручками в сторону красного цвета бахромы и корректируя при этом центровку зеркалом до момента симметричного распределения цвета бахромы.

5. Используя объектив $8\times$, фокусируют объект в области светлого пятна.

6. Слегка опуская конденсор, фокусируют в плоскости препарата изображение краев диафрагмы осветителя, т. е. получают изображение светлого пятна с четко очерченными краями.

7. С помощью зеркала переводят полученное яркое пятно в центр поля зрения.

Если все сделано правильно, то это светлое пятно, видимое одновременно с препаратом, будет равномерно освещено. В противном случае нужно добиться его равномерного освещения, слегка поворачивая корпус осветителя.

8. Открывают диафрагму осветителя так, чтобы светлое пятно заняло все поле зрения.

9. Устанавливают объектив $40\times$ для препарата «раздавленная капля» или $90\times$ для фиксированного окрашенного препарата, на который предварительно наносят иммерсионное масло, и фокусируют объект.

Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять! Никогда не следует поднимать и опускать конденсор или необоснованно использовать его ирисовую диафрагму для регулировки яркости поля зрения, так как это снижает разрешающую способность микроскопа, ухудшает изображение, может даже исказить его. Диафрагмой конденсора пользуются только для изменения контрастности изображения. Необходимость использования диафрагмы конденсора отпадает, если заранее привести в соответствие апертуру конденсора с апертурой используемого объектива. Как указывалось, апертура неиммергированного конденсора близка к 1, а числовая апертура объектива $40\times$ составляет 0,65. Практически можно воспользоваться следующим приемом: установив свет по Кёлеру и сфокусировав препарат с объективом $40\times$, вынуть окуляр и, глядя в тубус, прикрывать диафрагму конденсора до тех пор, пока края диафрагмы не станут видны у границы равномерно освещенной задней линзы объектива. В этот момент числовая апертура конденсора будет примерно равна числовой апертуре объектива. При работе с объективом $90\times$ диафрагму конденсора оставляют открытой, поскольку числовая апертура этого объектива 1,25.

Правила работы с иммерсионным объективом. Сухо окрашенный препарат (приготовление см. ниже) помещают на столик

микроскопа и, пользуясь объективом 8X, устанавливают свет по Кёлеру. Затем в центр препарата на мазок наносят каплю иммерсионного масла и заменяют сухую систему иммерсионной. С помощью макрометрического винта опускают тубус микроскопа до погружения объектива в масло. Эту операцию нужно проводить очень осторожно, следя сбоку за тем, чтобы фронтальная линза не коснулась предметного стекла и не получила повреждения. После погружения объектива в масло осторожно, также пользуясь макровинтом, поднимают тубус и, наблюдая в окуляр, находят плоскость препарата. Точная фокусировка достигается с помощью микрометрического винта.

По окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином или бензолом. Оставлять масло на поверхности линзы ни в коем случае нельзя, так как оно способствует фиксированию пыли и может со временем привести к повреждению оптики микроскопа. Эффективен способ удаления масла, как жидкого, так и застывшего, свежееотломленным пенопластом. В отдельных случаях помогает протирка тканью, смоченной дистиллированной водой. Края линз с выступающей оправой очищают с помощью палочки, обернутой тканью.

6.1.2. Микроскопия в темном поле

Микроскопия в темном поле основана на освещении объекта косыми лучами света. Эти лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если препарат содержит клетки микроорганизмов, то косые лучи, проходя через такой препарат, в значительной степени отражаются от поверхности клеток и настолько уклоняются от своего первоначального направления, что попадают в объектив. Тогда наблюдатель видит на черном фоне интенсивно светящиеся объекты, даже если их диаметр в 10 раз меньше, чем предел разрешения объектива. Такое освещение препарата достигается применением специального конденсора (рис. 47). Темнопольный конденсор имеет затемненную среднюю часть, поэтому центральные лучи света, идущие от зеркала, задерживаются, а в плоскость препарата попадают только боковые лучи, отраженные от зеркальных поверхностей, расположенных внутри конденсора (рис. 48).

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты, величина которых измеряется сотыми долями микрометра, т. е. лежит за пределами видимости обычного микроскопа. Однако наблюдение объектов в темном поле позволяет различить только их контуры, но не дает возможности рассмотреть внутреннее строение.

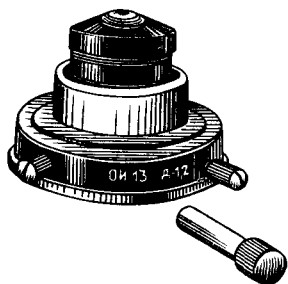


Рис 47. Конденсор темного поля ОИ-13

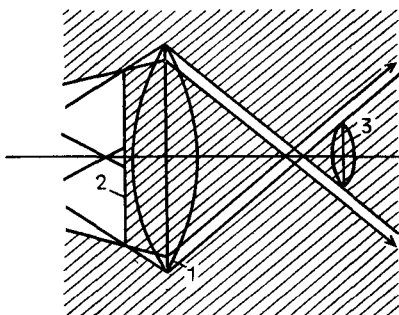


Рис 48. Схема хода лучей в конденсоре темного поля:

1 — линза конденсора; 2 — черная пластинка, задерживающая центральные лучи, 3 — объектив

УСЛОВИЯ РАБОТЫ С ТЕМНОПОЛЬНЫМ КОНДЕНСОРОМ

Успешная работа с темнопольным конденсором возможна только при строгом соблюдении ряда условий.

1. Апертура темнопольного конденсора должна быть на 0,2—0,4 единицы больше апертуры объектива (см. схему хода лучей в темнопольном конденсоре, рис. 48). В противном случае часть боковых лучей попадет в объектив, что вызовет частичное освещение поля зрения и снижение контраста. Поэтому наблюдение в темном поле ведут обычно с иммергированным конденсором, имеющим апертуру около 1,2 и сухими системами с числовой апертурой 0,65—0,85. Когда используют объектив с большей апертурой, то для получения четкого изображения объектив обязательно диафрагмируют, т. е. снижают его апертуру. С этой целью в объектив, извлеченный из револьвера, вводят специальную вставную диафрагму, которая входит в комплект выпускаемых темнопольных конденсоров. Еще удобнее пользоваться объективами, снабженными ирисовой диафрагмой, расположенной между линзами. Вращением специального кольца, имеющегося на оправе, изменяют диаметр отверстия диафрагмы и тем самым снижают числовую апертуру объектива.

2. Накал лампы осветителя должен быть максимальным, так как темнопольный конденсор пропускает лишь незначительную часть поступающего светового потока. Поэтому особое значение приобретает правильная установка света, максимальное его использование и особенно тщательная центровка.

3. Толщина предметных стекол не должна превышать 1,2 мм, так как все конденсоры темного поля имеют очень маленькое рабочее расстояние. В противном случае фокус конденсора окажется в толще предметного стекла, а не в плоскости препарата, и наблюдатель ничего не увидит.

4. Следует обращать внимание на толщину и чистоту препарата. Чем толще препарат и чем больше в нем посторонних частиц, преломляющих свет (пыль, пузырьки воздуха и т. д.), тем менее контрастным получается изображение, так как каждая частица, отражая лучи, освещает поле зрения. Поэтому для приготовления препарата используют тщательно очищенные предметные и покровные стекла.

ПОРЯДОК РАБОТЫ С ТЕМНОПОЛЬНЫМ КОНДЕНСОРОМ

1. Препарат «раздавленная капля», приготовленный на тонком и тщательно очищенном предметном стекле, помещают на столик микроскопа и фокусируют с объективом $8\times$. После этого положение тубуса не меняют до фокусировки препарата с объективом $40\times$.

2. Вынимают светлопольный конденсор и окуляр, вывинчивают один из объективов. Револьвер микроскопа МБР-1 имеет одно свободное от объектива отверстие, закрытое специальной заглушкой, так что можно воспользоваться этим отверстием, вывинтив заглушку.

3. Закрыв диафрагму осветителя, фокусируют изображение нити лампы на зеркале, прикрытом кружком белой бумаги, как при установке света по Кёлеру. Предварительно необходимо с помощью реостата уменьшить яркость света.

4. Открывают диафрагму осветителя. Прикрывают верхний конец тубуса микроскопа матовым стеклом (вместо окуляра) и, слегка поворачивая зеркало, добиваются равномерного освещения поля. После этого зеркало перемещать нельзя!

5. Вставляют окуляр и устанавливают объектив $8\times$. Осторожно, не задевая зеркала, устанавливают темнопольный конденсор таким образом, чтобы белый винт был обращен в сторону штатива микроскопа, а два регулировочных винта — в сторону осветителя. Надевают на регулировочные винты ключи.

6. Препарат сдвигают в сторону, на верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла и, несколько опустив конденсор, снова устанавливают препарат, закрепив его клеммами.

7. Поднимают конденсор вверх до соприкосновения масляной капли с предметным стеклом. Капля должна равномерно заполнить пространство между линзой конденсора и предметным стеклом и не содержать пузырьков воздуха.

8. Отключают реостат осветителя, т. е. получают максимальное освещение.

9. Глядя в окуляр, центрируют конденсор. Для этого с помощью регулировочных винтов приводят точно в центр поля зрения изображение светлого кольца с темным пятном в середине или только светлого пятна.

10. Слегка поднимая или опуская конденсор, устанавливают его в таком положении, чтобы в поле зрения исчезло темное пятно и осталось только замкнутое светлое пятно.

11. Ставят объектив $40\times$ и фокусируют препарат.

6.1.3. Микроскопия с фазово-контрастным устройством

Микроскопия с фазово-контрастным устройством основана на том, что с его помощью различия в фазе световых лучей, возникающие при прохождении их через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, в результате чего объекты становятся контрастными. Глаз человека выявляет различия в длине волны света (цвет) и ее амплитуде (интенсивность, яркость), но не в состоянии заметить смещение фазы. Неокрашенные клетки микроорганизмов хорошо видны в проходящем свете обычного светлопольного микроскопа только в том случае, когда значительная часть энергии света, прошедшего через них, поглощается. При этом выходящая из объекта (клетки) световая волна имеет меньшую амплитуду, т. е. яркость, и этот объект воспринимается глазом наблюдателя как более темный, контрастный по сравнению с окружающей средой. Однако многие микроорганизмы, размеры которых лежат в пределах разрешающей способности микроскопа, мало отличаются по прозрачности (плотности) от окружающей среды. Амплитуда световой волны, проходящей через клетки таких микроорганизмов, почти не меняется, поэтому объекты плохо различимы или даже невидимы в обычный светлопольный микроскоп. Поле зрения кажется наблюдателю почти однородным.

Объект можно сделать более контрастным, либо почти до предела закрывая диафрагму конденсора, либо окрашивая клетки, либо применяя фазово-контрастное устройство. Первое нежелательно, так как снижает апертуру конденсора и тем самым заметно уменьшает разрешающую способность микроскопа. Окрашивание препарата дает хорошие результаты, но в большинстве случаев оно осуществляется после фиксации микроорганизмов, что не всегда желательно. Основная ценность метода фазового контраста состоит в том, что он дает возможность наблюдать живые объекты, не прибегая к их фиксации и окрашиванию. Применение фазово-контрастного устройства не позволяет увеличить разрешающую способность микроскопа, но дает возможность увидеть прозрачные объекты более четко и даже выявить некоторые структуры и включения в клетках крупных бактерий.

Оптическая система, используемая для получения фазового контраста, состоит из фазовой пластинки и кольцевой диафрагмы. Фазовая пластинка расположена в задней фокальной плоскости объектива и представляет собой прозрачный диск, на котором напылено кольцо из металлов. Кольцевая диафрагма расположена под конденсором и представляет собой прозрачную щель в виде кольца на непроницаемой для света пластинке. Световая волна, проходя через клетки микроорганизмов, отстает по фазе примерно на $1/4\lambda$ относительно прямых волн, прошедших только через окружающую среду. В объективе микроскопа эти две волны интерферируют. Результирующая волна имеет ту же длину и амплитуду, что и прямая, но несколько отличается от нее по фазе.

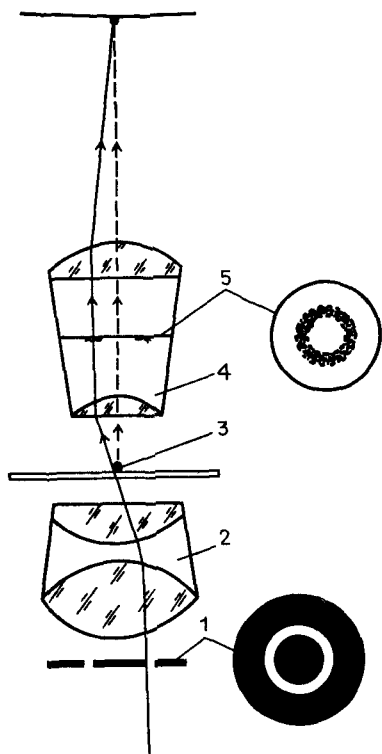


Рис. 49. Схема хода лучей при использовании фазово-контрастного устройства:
 1 — кольцевая диафрагма; 2 — конденсор; 3 — объект; 4 — объектив; 5 — фазовая пластинка

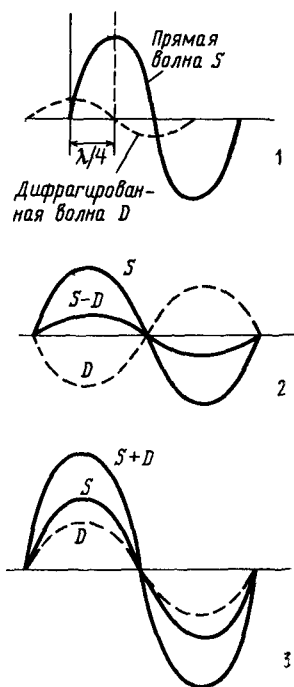


Рис. 50. Схемы, поясняющие принцип фазового контраста:
 1 — сдвиг фаз между дифрагированной (D) и прямой (S) волнами; 2 — темный контраст; 3 — светлый контраст

Этого отличия оказывается недостаточным, чтобы частицу можно было заметить в обычный микроскоп. Для превращения разности фаз в разность амплитуд служит фазовая пластинка, которая дополнительно сдвигает дифрагированный луч на $1/4\lambda$ (рис. 49).

Фазовый эффект создается в результате интерференции прямых лучей, не отклонившихся при прохождении через препарат, и боковых, дифрагированных лучей, которые благодаря прохождению через объект и через фазовую пластинку либо совпадают по фазе с прямыми, либо сдвинуты относительно них на $1/2\lambda$, т. е. находятся в противофазе. В первом случае обе волны складываются и изображение объекта становится более светлым, чем окружающий фон. Это светлый, негативный, контраст. По принципу негативного контраста устроен так называемый аноптральный микроскоп. Во втором случае дифракционная волна вычитается из прямой и объект выглядит более темным — темный, позитивный,

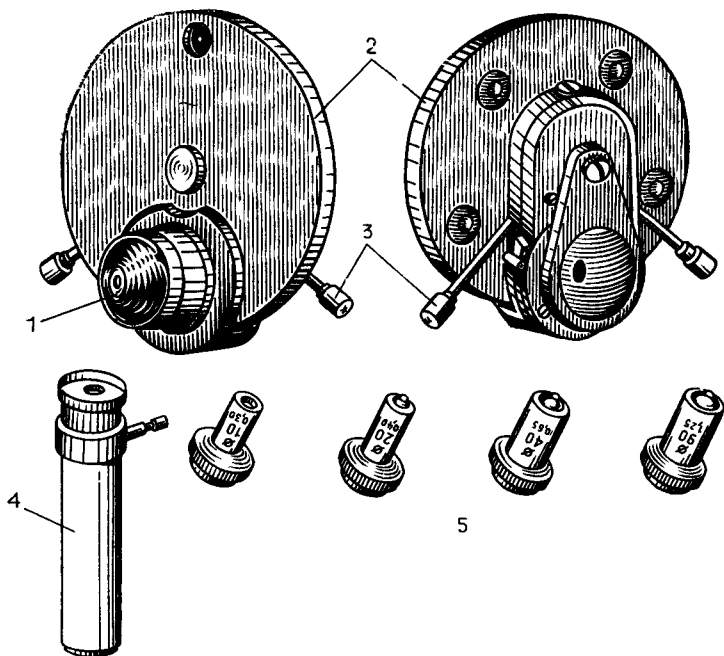


Рис. 51. Фазово-контрастное устройство КФ-4:
 1 — конденсор; 2 — револьверный диск с набором кольцевых диафрагм; 3 — центрировочные винты; 4 — вспомогательный микроскоп; 5 — набор фазовых объективов

контраст (рис. 50). Кроме того, кольцевая диафрагма уменьшает интенсивность центрального светового пучка, что также усиливает контрастность.

Широкое применение нашли фазово-контрастные устройства, выполненные по схеме позитивного контраста. Наиболее распространенной моделью является КФ-4 (рис. 51). Фазово-контрастное устройство представляет собой приставку к микроскопу, состоящую из вспомогательного окуляра, специальных фазовых объективов и конденсора с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует фазовой пластинке определенного объектива. Кольцевые диафрагмы установлены в револьверном диске под конденсором и поворотом диска могут легко меняться, причем в окне крышки диска появляется цифра, соответствующая увеличению применяемого объектива. Кроме того, в револьверном диске имеется свободное отверстие — «нулевая диафрагма» — для наблюдений обычным способом. Конденсор снабжен двумя винтами для центровки кольцевой диафрагмы относительно фазового кольца объектива. Все фазовые объективы имеют на оправе обозначение «ф». Ими можно пользоваться и при обычной микроскопии, но из-за наличия фазового кольца они дают изображение пониженного качества.

Методика исследования живых микроорганизмов с фазово-контрастным устройством сводится к следующему.

1. Удаляют из микроскопа обычный конденсор и на его месте устанавливают фазово-контрастный. Диск револьвера конденсора поворачивают таким образом, чтобы в окошке стояла цифра «0». Ирисовая диафрагма конденсора должна быть полностью открыта.

2. Заменяют объектив $40\times$ на фазовый объектив $40\times\phi$.

3. На предметный столик помещают препарат «раздавленная капля». Устанавливают свет по Кёлеру, пользуясь объективом $8\times$.

4. Устанавливают объектив $40\times\phi$.

5. Окуляр заменяют на вспомогательный и, перемещая тубус последнего, добиваются четкой фокусировки фазовой пластинки объектива. Она имеет вид темного кольца.

6. Поворотом диска револьвера включают кольцевую диафрагму, соответствующую объективу $40\times\phi$. Теперь под микроскопом видно не только фазовое кольцо, но и светлое кольцо — щель диафрагмы.

7. Пользуясь центрировочными винтами конденсора, перемещают кольцевую диафрагму так, чтобы она совместилась с фазовым кольцом (рис. 52). Если ширина темного кольца (фазовой пластинки) больше, чем ширина светлого кольца (щель диафрагмы), то необходимо, чтобы светлое кольцо вписалось в контур темного кольца концентрично.

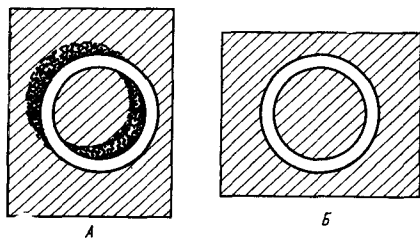


Рис 52 Центрировка кольцевой диафрагмы и фазовой пластинки
 А — неправильное положение, Б — правильное положение

8. Вспомогательный окуляр заменяют обычным и фокусируют препарат.

9. При микроскопировании с другими объективами устанавливают соответствующие кольцевые диафрагмы и каждый раз проверяют центрировку, пользуясь вспомогательным окуляром.

6.1.4. Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности многих веществ биологического происхождения и красителей светиться под воздействием падающего на них света. Молекулы веществ, способных к люминесценции, поглощают энергию падающего света и переходят в возбужденное состояние, которое характеризуется более высоким энергетическим уровнем. В таком состоянии они находятся непродолжительное время и вновь воз-

вращаются к исходному энергетическому уровню. Этот переход сопровождается отдачей избытка энергии в виде света — люминесценцией. Как правило, для возбуждения люминесценции объект освещают ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 300—400 нм или сине-фиолетовыми лучами с длиной волны 400—460 нм.

Ряд веществ биологического происхождения — хлорофилл, витамин В₂, алкалоиды, каротиноиды, порфирины, некоторые антибиотики и другие соединения обладает собственной люминесценцией. В зависимости от содержания таких веществ в клетке ряду микроорганизмов, например, зеленым водорослям, некоторым дрожжам и бактериям, свойственна первичная люминесценция. Однако клетки большинства микроорганизмов люминесцируют очень слабо, поэтому их обрабатывают специальными красителями — флуорохромами, обладающими люминесценцией. Люминесценцию объекта после обработки флуорохромами называют наведенной, или вторичной.

Люминесцентная микроскопия увеличивает контрастность изображения, дает возможность различить отдельные клеточные структуры и даже отметить их изменения при различных функциональных состояниях клетки. Этот вид микроскопии широко применяют для цитологических исследований, выявления живых и мертвых клеток, для изучения микроорганизмов в почвах, илах и ризосфере растений.

Люминесценцию в сине-фиолетовых лучах видимого света можно наблюдать с помощью обычного микроскопа, установив на пути лучей синий стеклянный или жидкий светофильтр, пропускающий сине-фиолетовые лучи видимого спектра. Синие лучи, мешающие выявлению люминесценции, убирают желтым светофильтром, который помещают на окуляр микроскопа. В результате наблюдатель видит на темном фоне люминесцирующие объекты. Однако для микробиологических исследований наиболее удобен люминесцентный микроскоп, в котором люминесценция возбуждается сине-фиолетовыми лучами и ближним ультрафиолетом. Оптическая схема микроскопа МЛ-2 позволяет наблюдать объекты при освещении их как в проходящем, так и в падающем свете. Чаще свет, возбуждающий люминесценцию, направляется на препарат сверху, через объектив. При освещении объектов сверху (для возбуждения люминесценции) одновременно допускается освещение объектов снизу с помощью конденсора темного поля ОИ-13 или фазово-контрастного устройства. Люминесцентный микроскоп также позволяет исследовать объекты в видимой области спектра в проходящем и отраженном свете в темном поле. Устройство люминесцентного микроскопа и порядок работы даны в описании каждой конкретной модели и здесь не приводятся.

Большинство микробиологических объектов рассматривают с объективами 40×, 70× или 90×. При переходе от объектива меньшего увеличения к объективу большего увеличения observa-

ют определенную последовательность. Просмотрев объект с меньшим увеличением, ставят объектив большего увеличения. Затем фокусируют препарат и вновь настраивают освещение, проверяя центричность и резкость изображения полевой диафрагмы и источника света. С иммерсионными объективами используют соответственно дистиллированную воду и нелюминесцирующее иммерсионное масло: вазелиновое или сандаловое.

6.1.5. Электронная микроскопия

В отличие от световых микроскопов электронные обслуживаются специалистами по их эксплуатации. Предел разрешения электронного микроскопа на три порядка выше, чем светового, и достигает 0,1 нм. В практике биологических исследований достигается разрешение 0,5—1,0 нм. Получаемое при этом увеличение составляет 5000—50000 крат (на экране микроскопа и фотопленке) и может быть повышено еще в 5—10 раз при фотопечати (в этом случае, однако, новых элементов структуры не выявляется, просто становятся видны мелкие детали, размеры которых меньше разрешения человеческого глаза, но больше размеров зерен фотоэмульсии).

Электронный микроскоп в отличие от светового позволяет исследовать только неживые высушенные объекты, так как образец находится в условиях высокого вакуума и интенсивного электронного облучения. Принцип возникновения изображения в электронном микроскопе иной, чем в световом. Как уже отмечалось, в световом микроскопе контраст обусловлен избирательным поглощением света различных длин волн элементами структуры объекта (адсорбционный контраст) или изменением фазы световой волны при прохождении света через объект (фазовый контраст), тогда как в электронном микроскопе контраст вызван отклонением ускоренных электронов тяжелыми атомами, входящими в состав тонкопленочного объекта (или искусственно внесенными в него при «химическом» контрастировании). Такой контраст называют дифракционным. Абсорбционный контраст в электронном микроскопе — явление нежелательное (поглощение энергии электронов приводит к хроматической аберрации, а часто и к тепловому разрушению образца), и с ним приходится бороться, исследуя объект в виде ультратонких (30—100 нм) срезов и пленок.

Основной частью электронного микроскопа является вакуумная колонна, в которой последовательно расположены по принципу осевой симметрии электронная пушка, содержащая катод и анод, а также ряд магнитных линз и люминесцирующий экран. Электронная пушка обеспечивает эмиссию и ускорение электронов. Часть электронов проходит через отверстие в центре анода (центральную апертуру) и образует электронный луч, который фокусируется первой магнитной линзой (конденсорной) и освещает объект. Прошедшие через объект электроны фокусируются

второй магнитной линзой (объективной), формирующей увеличенное изображение объекта, которое затем дополнительно увеличивается третьей магнитной линзой (проекционной) и проецируется на люминесцирующий экран или фотопленку.

Электронный микроскоп, создающий изображение благодаря прохождению (просвечиванию) электронов сквозь тонкопленочный образец, называется просвечивающим или трансмиссионным (ТЭМ). Он позволяет выявить детали внутреннего строения микроорганизмов, а также особенности их взаимодействия в анализируемом образце. Предварительно образец фиксируют химически, заливают в различные смолы и контрастируют солями тяжелых металлов. Часть электронов проходит через объект, часть в той или иной степени рассеивается тяжелыми атомами, связавшимися с компонентами структуры, вследствие чего и формируется контраст изображения. Необходимая для трансмиссионной микроскопии минимальная толщина образца обеспечивается применением специальных устройств для приготовления срезов — ультрамикротомов. Микроорганизмы и вирусы можно наблюдать в ТЭМ и без заливки в смолы. Для этого каплю суспензии помещают на пленку-подложку, высушивают и контрастируют химически или физически — косым напылением металлов (оттенение).

В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) или в просвечивающем электронном микроскопе со сканирующей приставкой изображение на телевизионном экране получается вследствие того, что первичный электронный луч, сканируя поверхность образца, взаимодействует с электронными оболочками атомов вещества объекта, что вызывает различные вторичные излучения. Их относительная интенсивность зависит от характеристик облучаемой поверхности рельефа, химического состава и электропроводности. Различия в интенсивности вторичных излучений преобразуются в изменение амплитуды электрических сигналов, что регистрируется на экране или фотопленке. Достижимое при этом полезное увеличение меньше, чем в ТЭМ, и, как правило, не превышает 50 000 крат (разрешение порядка 3—5 нм). Сканирующая электронная микроскопия позволяет получить трехмерное (стереоскопическое) изображение и наиболее эффективна для выявления поверхностных структур микроорганизмов, определения формы и архитектоники объекта. Предварительно образец фиксируют химически, высушивают специальными методами и напыляют в вакууме золотом, платиной или палладием для повышения интенсивности вторичноэлектронной эмиссии и создания на поверхности электропроводящего покрытия, снимающего поверхностный заряд.

6.2. ИЗУЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В СВЕТОВОМ МИКРОСКОПЕ

Морфологические особенности клеток микроорганизмов можно изучать, используя различные методы микроскопии, а также применяя некоторые способы дифференциальной окраски. Выбор ме-

тодов микроскопического анализа и способов окраски определяется конкретной целью исследования. Однако существует ряд приемов, которые имеют принципиальное значение и лежат в основе большинства специальных методов исследования морфологии и цитологии бактерий. Это некоторые способы приготовления препаратов, фиксации и окраски клеток.

Препараты готовят, как правило, на предметных стеклах, толщина которых не должна превышать 1,2—1,4 мм. Применение более толстых стекол не позволяет получить резкое изображение краев диафрагмы осветителя в плоскости препарата, так как оно попадает в толщу стекла, что нарушает фокусировку конденсора и резко снижает четкость изображения. Чрезмерная толщина предметного стекла недопустима при работе с иммерсионным объективом, когда необходимо полностью использовать числовую апертуру системы.

Существенным моментом является подготовка поверхности предметных стекол, что особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы капля жидкости равномерно расплывалась по стеклу, а не собиралась в выпуклые, медленно высыхающие капельки. Наиболее надежный способ обезжиривания — обработка стекол хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой и спиртом. В повседневной работе, однако, вполне достаточно бывает тщательно натереть сухое стекло мылом, после чего вытереть его чистой хлопчатобумажной салфеткой. Хорошее обезжиривание достигается протиранием вымытых и высушенных стекол ватой, смоченной эфиром (после этого промывание водой не требуется), или обжиганием поверхности стекол в пламени горелки (жир при этом сгорает). Кипячение стекол в растворах щелочей не рекомендуется, так как щелочи разъедают стекло и поверхность его становится матовой. Хранить чистые обезжиренные стекла можно в сухом состоянии или в этаноле.

Покровные стекла, применяемые для приготовления препаратов микроорганизмов, также должны быть тщательно вымыты и высушены. Толщина покровных стекол не должна превышать 0,15—0,17 мм. Более толстые стекла резко ухудшают качество получаемого изображения.

6.2 1. Препараты живых клеток микроорганизмов

Препарат «раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и помещают в нее небольшое количество клеток изучаемых микроорганизмов, размещают и накрывают покровным стеклом. Микроорганизмы, выращенные на плотной питательной среде, переносят в каплю воды бактериологической петлей, выращенные в жидкой среде, — стерильной пипеткой. В этом случае каплю воды на предметное стекло можно

не наносить. 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 необходимо удалить фильтровальной бумагой.

Препарат «висячая капля». Каплю суспензии микроорганизмов петлей или обычным пером наносят на покровное стекло, которое поворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой) в центре. Капля должна свободно висеть, не касаясь краев и дна лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином. Капля оказывается герметизированной во влажной камере, что делает возможным многодневное наблюдение за объектом. Для длительных наблюдений используют стерильные стекла, а суспензию микроорганизмов готовят в жидкой питательной среде.

Препарат «отпечаток». Из агаризованной среды, на которой микроорганизмы растут сплошным газоном или в виде отдельных колоний, вырезают скальпелем небольшой кубик и переносят его на предметное стекло так, чтобы поверхность с микроорганизмами была обращена вверх. Затем к газону или к колонии прикладывают чистое покровное стекло, слегка надавливают на него петлей или пинцетом и тотчас же снимают, стараясь не сдвинуть в сторону. Полученный препарат помещают отпечатком вниз в каплю воды или метиленового синего (1:40) на предметное стекло. Отпечаток можно получить и на предметном стекле, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом.

Препараты живых клеток рассматривают с «сухими системами» микроскопа. Препараты, работа с которыми закончена, прежде чем вымыть, выдерживают в дезинфицирующем растворе.

Препарат «микрочультура» или «агаровая пленка». На тонкое, простерилизованное и нагретое предметное стекло наносят стерильной нагретой пипеткой 0,2—0,3 мл горячей агаризованной питательной среды и распределяют по всей поверхности стекла. После застывания среды петлей удаляют лишний агар, оставляя два тонких участка пленки величиной с покровное стекло каждый. В центр квадратов бактериальной петлей или пипеткой наносят каплю жидкой культуры или суспензии клеток микроорганизма. Стекло помещают во влажную камеру (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги), которую ставят в термостат. Перед микроскопированием на пленку с выросшей микрочультурой наносят каплю красителя или каплю воды в случае подсыхания пленки и затем осторожно накрывают покровным стеклом.

Метод, основанный на получении роста микроорганизма непосредственно на предметном стекле, позволяет вести микроскопическое наблюдение за процессами роста и развития, влиянием токсических и других агентов на эти процессы. На препаратах не нарушается естественное расположение клеток в растущей коло-

нии. Рост можно осуществлять в аэробных или анаэробных (под покровным стеклом) условиях.

Агаровую пленку можно нанести на покровное стекло и приготовить препарат «висячая капля». На таком препарате можно наблюдать движение бактерий по типу скольжения.

6.2.2. Препараты фиксированных окрашенных клеток микроорганизмов

Приготовление фиксированных окрашенных препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На обезжиренное спиртом предметное стекло помещают маленькую каплю водопроводной воды и переносят в нее петлей небольшое количество исследуемого материала, как для препарата «раздавленная капля». Полученную суспензию равномерно размазывают петлей на площади 1—2 см² возможно более тонким слоем. Мазок должен быть настолько тонок, чтобы высыхал после приготовления.

Высушивание мазка. Лучше всего сушить готовый препарат при комнатной температуре на воздухе. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает очень быстро. Если высушивание мазка замедленно, то препарат можно слегка нагреть в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить осторожно, не перегревая мазка, 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, так как мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые. Самым распространенным способом фиксации является термическая обработка. Для этого препарат обычно трижды проводят через наиболее горячую часть пламени горелки, держа предметное стекло мазком вверх. Не следует перегревать мазок, так как при этом происходят грубые изменения клеточных структур, а иногда и внешнего вида клеток, например их сморщивание. Для исследования тонкого строения клетки прибегают к фиксации различными химическими веществами (см. Приложение). Фиксирующую жидкость наливают на мазок, либо препарат на определенное время погружают в стакан с фиксатором.

Окраска. Клетки микроорганизмов окрашивают главным образом анилиновыми красителями. Различают кислые и основные красители. К кислым красителям относятся те, у которых ион, придающий окраску (хромофор), — анион. У основных красителей хромофором является катион. Примером кислых красителей служит эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин; все эти красители интенсивно связываются с цитоплазматическими компонентами клетки. Основные красители — метиленовый синий, ос-

новой фуксин, генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, сафранин — интенсивнее связываются с ядерными компонентами клетки. Высокая концентрация ДНК и рибосомальной РНК в клетке бактерий делает ее более чувствительной к основным красителям. В связи с этим в микробиологической практике применяются почти исключительно основные красители.

Различают 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 определенных ее структур. С помощью дифференциальной окраски выявляют некоторые клеточные структуры и запасные вещества.

Для простого окрашивания клеток микроорганизмов чаще всего пользуются фуксином, генциановым фиолетовым, метиленовым синим. Фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие над кюветой, и заливают красителем на 1—3 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 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 с объективом 90X. Для получения более чистых препаратов краситель наливают на мазок, покрытый фильтровальной бумагой. Метод окрашивания в модификации Синева позволяет использовать вместо растворов красителей фильтровальную бумагу, заранее пропитанную красителем.

В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения светлое и чистое, окрашены только клетки микроорганизмов. Фиксировать и окрашивать можно также и препараты «отпечатки». Фиксированные, окрашенные препараты могут храниться длительное время.

Форму клеток и их сочетания (цепочки, розетки, пакеты, тетрады и т. д.) выявляют, как правило, на препаратах «раздавленная капля» в светлопольном или фазово-контрастном микроскопе. Для определения формы клеток мелких палочковидных бактерий таких, как *Serratia marcescens*, готовят препарат фиксированных клеток и окрашивают их простым способом. Клетки мелких бактерий, имеющих выросты (роды *Stella*, *Caulobacter*, *Prosthecomicrobium*), целесообразно исследовать в темном поле. Естественное расположение клеток в колонии микроорганизмов, а также спор и спораносцев у актиномицетов и мицелиальных грибов изучают на препарате «отпечаток».

Необходимо помнить, что возраст культуры, состав среды и условия культивирования существенно влияют на морфологию и цитологию микроорганизмов.

6.2.3. Определение размеров клеток микроорганизмов

Клетки микроорганизмов измеряют под микроскопом с помощью окулярной линейки — микрометра или окулярного винтового микрометра. Для измерения лучше использовать живые, а не фиксированные клетки, так как фиксация и окраска клеток приводят к некоторому изменению их истинных размеров. Удобно определять размеры клетки, пользуясь фазово-контрастным устройством. Если клетки подвижны, препарат слегка подогревают или к капле исследуемой суспензии добавляют каплю 0,1%-ного водного раствора агара. Размеры клеток выражают в микрометрах (мкм).

Окулярный микрометр представляет собой круглую стеклянную пластинку, в центре которой выгравирована линейка длиной 5 мм. Линейка разделена на 50 частей. Окулярный микрометр вставляют в окуляр. Для этого вывинчивают глазную линзу окуляра, помещают на его диафрагму окулярный микрометр делениями вниз и закручивают линзу. Однако делениями окуляр-микрометра нельзя непосредственно измерить величину клетки, так как последние рассматриваются через объектив и окуляр, а деления линейки — только через верхнюю линзу окуляра. Поэтому, прежде чем приступить к измерению величины клеток, необходимо определить цену деления окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа, что делают с помощью объективно-го микрометра.

Объективный микрометр (рис. 53) — это металлическая пластинка с отверстием в центре. В отверстие вставлено стекло, на которое нанесена линейка длиной 1 мм. Она разделена на 100 частей, т. е. деление объективного микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мкм. Для определения цены делений окулярного микрометра объективный микрометр помещают на столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и только после этого

меняют объектив на тот, при котором будут определяться размеры клеток. Перемещая столик микроскопа и поворачивая окуляр, устанавливают микрометры так, чтобы их шкалы были параллельны и одна перекрывала другую. Цену деления окулярного микрометра определяют по принципу нониуса, т. е. совмещают одно из делений шкалы окулярного и объективного микрометров и находят следующее их совмещение (рис. 54). Устанавливают, скольким делениям объективного микрометра соответствует 1 деление окуляр-

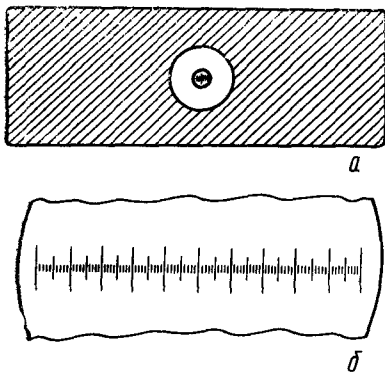


Рис. 53 Объективный микрометр
а — общий вид, б — вид под микроскопом

ного микрометра. Например, 2 деления объект-микрометра (20 мкм) соответствуют 5 делениям окуляр-микрометра, следовательно, 1 деление окуляр-микрометра равняется 4 мкм (20:5). Если теперь на столик микроскопа положить препарат с клетками микроорганизмов и рассматривать его при том же увеличении, то можно измерить величину клетки. Для этого определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует величина измеряемого объекта, и умножают это число на цену деления окулярного микрометра.

Удобно определять размеры клеток с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-15. Винтовой окулярный микрометр закрепляют на тубусе микроскопа, предварительно вынув окуляр. В окуляре винтового микрометра имеется неподвижная шкала с ценой деления 1 мм для определения размеров крупных объектов и подвижная стеклянная пластинка с перекрестием. Пластинка связана с микрометрическим винтом-барabanом и перемещается вместе с перекрестием при его вращении. Для измерения длины клетки вращением микрометрического винта-барабана окулярного микрометра подводят перекрестие к концу клетки и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до другого конца клетки и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует длина клетки, и умножают полученное значение на цену деления барабана при данном увеличении микроскопа.

Цену деления барабана для каждого объектива определяют с помощью объективного микрометра. С этой целью подводят перекрестие к началу одного деления объективного микрометра и отмечают деление на барабане. Затем, вращая барабан, перемещают перекрестие до конца деления объективного микрометра и вновь отмечают деление на барабане. Определяют, скольким делениям микрометрического винта-барабана соответствует 1 деление объективного микрометра. Например, 1 деление объективного микрометра, т. е. 10 мкм, соответствует X делениям микрометрического винта-барабана, следовательно, 1 деление его при данном увеличении микроскопа равно $10 : X$ мкм.

Чтобы результаты были достоверными, необходимо измерить не менее 20—30 клеток. При определении размеров округлых форм измеряют диаметр клеток, у других форм — длину и ширину, указывают средние размеры клеток и пределы колебаний, т. е. минимальные и максимальные размеры.

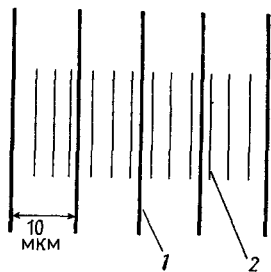


Рис 54 Определение цены деления объективного микрометра:

1 — деление объективного микрометра; 2 — деление окулярного микрометра

6.2.4. Клеточные структуры и запасные вещества

Капсулы. Клетки многих микроорганизмов, особенно при росте их на средах, богатых углеводами, могут быть окружены рыхлым внешним слоем — капсулой или слизью. Эти структуры часто имеют консистенцию геля и плохо видны при микроскопировании живых клеток. Химический состав капсул у разных бактерий неодинаков, поэтому их нельзя выявить каким-либо одним методом окраски. Кроме того, капсулы при окраске 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. Для этого небольшое количество клеток с плотной среды помещают в каплю разбавленного фуксина, смешивают с каплей туши, закрывают покровным стеклом и просматривают с объективом 40X. На общем темном фоне препарата хорошо видны бесцветные капсулы, окружающие клетки микроорганизмов, окрашенные в розовый цвет. Кроме того, существуют специальные методы окраски капсул, один из них приведен ниже.

Окраска капсул по методу Гинса. На конец предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю черной туши, вносят в нее клетки, хорошо перемешивают и ребром покровного стекла делают мазок по всей поверхности стекла. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют 5—10 мин смесью Никифорова или 3 мин абсолютным метанолом. Далее мазок окрашивают карболовым фуксином Циля, разбавленным водой в соотношении 1:3. Время окрашивания — 2—3 мин. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсионной системой. На темно-сером фоне препарата контрастно выделяются розово-малиновые клетки бактерий, окруженные бесцветными капсулами.

Клеточная стенка. Тонкую структуру клеточной стенки хорошо видно лишь в электронном микроскопе. Для наблюдения клеточной стенки в световом микроскопе применяют метод темного поля либо специальную окраску, с помощью которой удастся легко выявить границы между отдельными клетками, расположенными в виде длинных нитей или плотных агрегатов. На обезжиренном стекле делают мазок клеток исследуемых бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 5 мин 5%-ным раствором фосфоромолибденовой кислоты. Затем препарат промывают водой и окрашивают не более 15 с 0,02%-ным раствором кристаллвиолета. Снова промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клеточная стенка окрашивается в черный, а цитоплазма — в бледно-сиреневый цвет.

Можно использовать метод окраски клеточной стенки по Гутштейну. Мазок выдерживают 15 мин в жидкости Карнуа, протравляют в течение 25 мин 10%-ным водным раствором таннина,

промывают водой и окрашивают водным фуксином или 0,02%-ным раствором кристаллического фиолетового в течение 30—60 с. Затем препарат промывают, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Окраска по Граму. С молекулярной организацией и химическим составом клеточной стенки связывают способность бактерий окрашиваться по Граму. Эта окраска является важным диагностическим признаком, она коррелирует со многими другими свойствами бактерий. По способности окрашиваться красителями триметилфенолового ряда все бактерии делятся на две группы: грамположительные и грамотрицательные. Грамположительные бактерии удерживают комплекс генцианового фиолетового с йодом при обработке препарата спиртом и поэтому окрашиваются в фиолетовый цвет. Грамотрицательные бактерии не обладают такой способностью и обесцвечиваются спиртом. При последующей обработке фуксином или сафранином они приобретают розовую окраску.

Как правило, по Граму окрашивают клетки молодых, чаще всего суточных, культур, так как способность удерживать краситель зависит от физиологического состояния бактерий. Например, некоторые бактерии после прекращения активного роста теряют способность окрашиваться по Граму.

Окраска по Граму заключается в следующем. На одном обезжиренном стекле делают мазки разных микроорганизмов: в центре — мазок клеток исследуемой культуры, слева и справа — контрольных культур. Клетки одной контрольной культуры должны быть грамположительными (например, *Micrococcus luteus* или *Bacillus cereus*), другой — грамотрицательными (например, *Escherichia coli*). Мазки следует готовить тонкими, чтобы клетки равномерно распределялись по поверхности стекла и не образовывали скоплений. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают в течение 1—2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым. Затем краситель сливают и, не промывая мазок водой, обрабатывают его 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 грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грамотрицательные — розово-красный цвет.

Выявление кислотоустойчивости. Кислотоустойчивость — свойство, характерное для некоторых микобактерий и нокардий. Оно заключается в сохранении окраски клетками этих бактерий при обработке их кислотой. Кислотоустойчивость обусловлена особенностями химического состава клеточной стенки вышеупомянутых бактерий: высоким содержанием в ней сложных липидов и, в частности, наличием миколовых кислот.

Наибольшее распространение получил способ выявления кислотоустойчивости по Циль — Нильсену. На обезжиренном предметном стекле готовят два мазка: исследуемых клеток и клеток кислотоустойчивых микобактерий. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют над пламенем горелки. На мазки помещают фильтровальную бумагу, заливают препарат карболовым фуксином Циля и затем 2—3 раза подогревают его до появления паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. За появлением паров наблюдают, глядя на мазок сбоку, и при их появлении тотчас отставляют препарат в сторону. После этого препарату дают остыть, снимают фильтровальную бумагу, сливают краситель и мазок промывают водой. Затем препарат обесцвечивают 5%-ным раствором H_2SO_4 . Для этого предметное стекло погружают 2—3 раза в стакан с 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 исследуют с иммерсионной системой. При строгом соблюдении режима окраски кислотоустойчивые клетки приобретают красный цвет, тогда как некислотоустойчивые — синий. Кислотоустойчивость можно определить у клеток любого возраста.

Жгутики. Способность к движению у большинства микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. Расположение и количество их у различных бактерий варьируется и имеет диагностическое значение. Особенно важен этот признак для идентификации палочковидных грамотрицательных бактерий. По характеру движения бактерий в препарате можно предположительно судить о типе жгутикования. Если жгутики расположены на одном или на двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое — «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону; при латеральном или перитрихальном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения.

Отдельный бактериальный жгутик настолько тонок, что неразличим в световом микроскопе, если он не окрашен особым способом, который увеличивает кажущуюся толщину жгутика. Так, диаметр отдельных жгутиков колеблется в пределах 0,01—0,02 мкм (у *Bdellovibrio* 0,04—0,06 мкм), а максимальное разрешение светового микроскопа составляет 0,2 мкм. Лишь у немногих бактерий, например у представителей рода *Spirillum*, пучки жгутиков достаточно плотны и их удается обнаружить при наблюдении в светлом поле с помощью фазово-контрастного устройства или в темном поле.

Существует несколько способов окраски жгутиков. Все они основаны на использовании различных протрав, осаждающихся на поверхности жгутиков, благодаря чему диаметр жгутиков увеличивается и они становятся видимыми в световом микроскопе. Окраска жгутиков требует тщательной подготовки клеток и аккурат-

ности в работе, так как жгутики легко обламываются даже при легком взбалтывании суспензии.

Окраска жгутиков по методу Леффлера в модификации Пешкова. Бактерии, предназначенные для окраски жгутиков, ежедневно в течение 2—3 дней пересевают в свежую жидкую или на плотную среду, содержащую не более 1,5% агара. Для окраски жгутиков используют клетки 12—16-часовой культуры. Клетки осторожно берут петлей и переносят в пробирку со стерильной водой, подогретой до температуры, при которой их выращивали. Прежде чем делать мазок, каплю полученной суспензии просматривают под микроскопом и убеждаются в том, что клетки подвижны и плотность суспензии невелика — 5—10 клеток в поле зрения.

Клетки легко теряют жгутики в момент приготовления мазка, поэтому необходимо обращать внимание на чистоту стекла и способ нанесения на него суспензии. Предметные стекла должны быть тщательно обезжирены. Непосредственно перед приготовлением мазка стекло 3—4 раза проводят через наиболее горячую часть пламени горелки. Дают стеклу остыть и пастеровской пипеткой или петлей наносят 3—4 маленькие капли на стекло. Капли должны хорошо расплываться по стеклу и быстро высыхать. Высушенный мазок заливают протравой. Необходимо следить, чтобы протрава не подсыхала. Через 15 мин протраву смывают дистиллированной водой и препарат окрашивают в течение 5 мин разбавленным фуксином Циля, погружая его мазком вниз в раствор красителя. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и исследуют с иммерсионной системой. Обращают внимание на расположение жгутиков, их количество и длину.

По методу Рыжковой препарат заливают протравой через воронку с фильтром и трижды в течение 3—5 мин подносят стекло к пламени горелки до появления паров. Затем протраву сливают и препарат заливают через воронку с фильтром раствором Циля на 5—10 мин.

Окраска жгутиков по способу Фонтана. Для окраски жгутиков используют клетки 12—16-часовой культуры, выращенной на скошенной агаризованной среде с конденсационной водой. Культуру вынимают из термостата и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. В пробирку с 0,5 мл водопроводной стерильной воды вносят клетки, взятые на границе с конденсационной водой. Материал берут осторожно, следует только коснуться бактериологической петлей поверхности культуры. Петлю с бактериальной массой оставляют в воде на 1 ч. За это время подвижные бактерии окажутся свободно взвешенными в воде. Затем петлю вынимают, прокаливают, охлаждают и только после этого ею берут капли взвеси бактерий и осторожно наносят их на обезжиренное стекло. Нанесенные капли не размазывают, они должны быстро высохнуть, лучше в термостате. Мазки фиксируют 5 мин жидкостью Руге. Препарат промывают водой, заливают протравой и подогревают стекло до появления паров в течение

2 мин. Протраву сливают и препарат тщательно промывают водой. Далее обработку препарата проводят серебрением. Разбавленный аммиачный раствор серебра наливают на мазок и стекло несколько раз осторожно подогревают в течение 2 мин до появления паров. Препарат промывают водой, высушивают и микрофотографируют с иммерсионной системой. Бактерии в препарате окрашены в черный или темно-коричневый цвет, а жгутики, часто спутанные, — в светло-коричневый или желтый.

Нуклеоид. Обнаружить нуклеоид в бактериальной клетке при помощи светового микроскопа трудно. Основные красители, избирательно окрашивающие хроматин ядер эукариотических клеток, равномерно и интенсивно окрашивают всю прокариотную клетку. Для избирательного окрашивания нуклеоида фиксированные клетки предварительно обрабатывают рибонуклеазой или разбавленной соляной кислотой, чтобы разрушить рибосомальную РНК. Последующее окрашивание основным красителем позволяет выявить нуклеоид в виде плотных тел, имеющих неправильные очертания и расположенных в центре или на обоих полюсах клетки. Довольно четко нуклеоид обнаруживается у следующих бактерий: *Proteus vulgaris*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*.

Для выявления нуклеоида поступают следующим образом. На предметном стекле делают мазок суточной культуры бактерий, высушивают его на воздухе и фиксируют в течение 2—3 мин в парах 2%-ного раствора осмиевой кислоты. С этой целью на дно чашки Петри наносят 2—3 капли фиксатора, а предметное стекло помещают мазком вниз на обрезки стекла. По окончании фиксации препарат опускают на 2—3 мин в стаканчик с раствором 1 н. HCl для гидролиза рибосомальной РНК. Стакан держат на водяной бане при 60°. После гидролиза препарат немедленно промывают водой. Затем мазок помещают на 15 мин в 1%-ный раствор формалина, вновь промывают водой и окрашивают в течение 1—2 мин 0,1—1,0%-ным водным раствором основного фуксина. Препарат промывают, высушивают и микрофотографируют с иммерсионной системой. Цитоплазма окрашивается в розовый цвет, нуклеоид — в ярко-малиновый.

Многие микроорганизмы в определенных условиях образуют запасные вещества, которые обнаруживаются в клетке в виде гранулярных цитоплазматических включений. Природа запасных веществ различна. Чаще всего это полисахариды, липиды, полифосфаты. Некоторые бактерии накапливают в клетках серу.

Гранулы углеводной природы (полисахариды) выявляют при обработке клеток раствором Люголя. Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микрофотографируют. Гранулы крахмалоподобных веществ — гранулезы — окрашиваются в синий, а гранулы гликогенподобных полисахаридов — в красновато-коричневый цвет. Гликоген при окраске Люголем легко

выявляется у дрожжей, гранулеза характерна для бактерий рода *Clostridium*. Реакция на гликоген хорошо идет только в кислой среде, поэтому перед выявлением в клетках гликогена среду, в которой выращивали микроорганизмы, подкисляют.

Липидные гранулы. У дрожжей и мицелиальных грибов запасные липиды представлены нейтральными жирами, которые легко обнаруживаются в живых клетках без специальных методов окраски в виде сильно преломляющих свет капель. Бактерии в качестве резервных липидов образуют поли- β -оксимасляную кислоту. Гранулы поли- β -оксибутирата хорошо заметны при микроскопировании живых бактериальных клеток с фазово-контрастным устройством, однако чаще для их выявления клетки окрашивают липофильными красителями — суданом III или суданом черным. Готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе и фиксируют в пламени горелки. Заливают поверхность мазка раствором судана черного и оставляют краситель на 5—15 мин. Избыток красителя сливают, просушивают препарат фильтровальной бумагой, просветляют в ксилоле, погружая в него несколько раз предметное стекло. Время просветления препарата не должно превышать 1 мин. После этого клетки дополнительно окрашивают в течение 10 с 0,1%-ным водным раствором сафранина. Более длительная обработка сафранином нежелательна, так как маскируется основная окраска. Гранулы поли- β -оксибутирата окрашиваются в темный цвет, остальная часть клетки — в розовый.

Полифосфаты (син. волютин и метахроматин). В клетках прокариот волютин локализован в цитоплазме, в клетках эукариот — в вакуолях. Окраска волутиновых гранул основана на свойстве метахромазии — способности вызывать изменение цвета некоторых красителей (метиленовый синий, толуидиновый синий). Готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе и фиксируют в пламени горелки. На фиксированный мазок наливают метиленовый синий по Леффлеру и окрашивают клетки в течение 10 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки окрашиваются в голубой цвет, а зерна волютина — в фиолетово-красный. Волютин легко выявить окраской по способу Омелянского, основанному на плохой растворимости волютина в растворах кислот. В этом случае на фиксированный в пламени горелки мазок наливают карболовый фуксин Циля и окрашивают клетки в течение 0,5—1,0 мин. Краску сливают, промывают препарат водой и обесцвечивают 1%-ным раствором H_2SO_4 в течение 20—30 с. Затем кислоту сливают, препарат промывают водой и дополнительно окрашивают 20—30 с метиленовым синим (1:40). Снова промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильном окрашивании гранулы волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы.

Для выявления волютина у дрожжей применяют следующий способ. Фиксированный в пламени горелки мазок окрашивают ме-

тиленовым синим по Леффлеру в течение 3 мин. Краситель сливают, препарат промывают водой и, не высушивая, наносят на мазок небольшую каплю 1%-ного раствора серной кислоты; мазок накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Волутин имеет вид капель сине-фиолетового цвета на слабо-голубом фоне цитоплазмы.

Включения серы встречаются только у некоторых бактерий. Благодаря двойному лучепреломлению капли серы хорошо заметны в клетках без специального окрашивания. Включения серы растворяются при обработке клеток абсолютным спиртом, сероуглеродом или ледяной уксусной кислотой.

Параспоральные тельца. Спорулирующая клетка *Bacillus thuringiensis* образует примыкающий к споре правильный бипирамидальный белковый кристалл, который высвобождается вместе со спорой при автолизе материнской клетки. Для обнаружения параспоральных телец применяют специальную окраску. Готовят тонкий мазок клеток, высушивают его на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и в течение 2 мин окрашивают анилиновым черным. Затем осторожно смывают краску водой и мазок в течение 15 с докрашивают фуксином Циля. Препарат промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой. При правильной окраске кристаллы белка (параспоральные тельца) окрашиваются в черный, а остальная часть клетки — в розовый цвет. Параспоральные тельца можно наблюдать и в живых клетках, используя фазово-контрастное устройство. В этом случае параспоральные тельца выглядят как гранулы, способные сильно преломлять свет.

6.2.5. Эндоспоры

Эндоспоры образуют бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium* и некоторых других. Для обнаружения способности клеток к спорообразованию лучше использовать старые культуры. Споры можно обнаружить при наблюдении живых клеток, а также путем дифференциального окрашивания цитоплазмы и споры. В случае выявления у микроорганизма способности к образованию спор необходимо обратить внимание на тип спорообразования (бацилярный, клостридиальный, плектридиальный), расположение споры в клетке (центральное, эксцентральное 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.

Наблюдение спорообразования в микрокультуре. На стерильном предметном стекле, как описано выше (см. 6.2.1.), получают тонкую пленку агаризованной питательной среды, благоприятной для спорообразования (например, картофельного агара). В центр

пленки наносят петлей каплю жидкой 24-часовой культуры *Bacillus megaterium* или другой крупной спорообразующей бактерии. Полученный препарат инкубируют при 37° во влажной камере в течение 20—24 ч. Перед микроскопированием препарат подкрашивают метиленовым синим по Леффлеру и осторожно накладывают покровное стекло. Микроскопируют с иммерсией или фазовым контрастом. Просматривают край колонии, обращая внимание на расположение клеток и на клетки в разных стадиях спорообразования.

Наблюдение живых клеток. Споры по сравнению с цитоплазмой характеризуются более высоким показателем преломления света, поэтому при микроскопировании в светлом поле они видны как более темные включения округлой или овальной формы. При использовании фазово-контрастного устройства споры имеют вид светлых включений на фоне почти черных клеток.

Метод выявления спор негативным окрашиванием. На предметном стекле готовят тонкий мазок клеток спорулирующих бактерий, подсушивают на воздухе и фиксируют в пламени. Затем на 3—5 мин наносят метиленовый синий или на 1—3 мин фуксин, после чего препарат осторожно промывают водой и подсушивают на воздухе. Просматривают с иммерсией.

Вегетативные клетки бактерий прокрашиваются, а споры, имеющие многослойную, труднопроницаемую оболочку — нет. Они видны как сильно преломляющие свет сферические или овальные образования, находящиеся в зависимости от стадии спорообразования внутри или вне клеток бактерий.

Метод удобен при количественной оценке процесса спорообразования путем подсчета количества спор и вегетативных клеток в разных условиях роста бактерий.

Дифференциальная окраска споры и цитоплазмы по методу Пешкова. Споры и цитоплазму окрашивают при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

На обезжиренном предметном стекле готовят мазок, высушивают его на воздухе, фиксируют в пламени горелки и заливают раствором метиленового синего по Леффлеру. Краситель доводят до кипения, держа предметное стекло над пламенем горелки. По мере испарения красителя добавляют новые его порции. Продолжительность окраски, считая с момента закипания красителя, — 10—20 с. Затем предметное стекло охлаждают, препарат тщательно промывают водой, после чего клетки в течение 30 с докрашивают 0,5%-ным водным раствором нейтрального красного или сафранина. Краситель сливают, препарат промывают водой и просматривают с иммерсионной системой. При правильном окрашивании клетки имеют красный, а споры — синий цвет. Вместо метиленового синего можно использовать малахитовый зеленый. В этом случае препарат, фиксированный в пламени горелки, заливают на 7—10 мин 7,5%-ным раствором малахитового зеленого.

Окрашивание проводят с подогревом, помещая препарат над сосудом с кипящей водой или над пламенем горелки. По окончании окраски предметное стекло охлаждают, промывают препарат водой и докрашивают клетки 0,25%-ным водным раствором сафранина в течение 1—2 мин. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки — в розовый.

63. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Как уже отмечалось (6.1.4), некоторые микроорганизмы обладают собственной (первичной) люминесценцией, что связано с наличием в их клетках люминесцирующих веществ — хлорофилла, каротиноидов, рибофлавина, алкалоидов, порфиринов, некоторых антибиотиков. Такие микроорганизмы можно изучать в люминесцентном микроскопе на препаратах «раздавленная капля». Однако в большинстве случаев применяется предварительная обработка клеток специальными красителями — флуорохромами, что приводит к вторичной люминесценции. Существуют природные и синтетические флуорохромы. Широко используются акридин оранжевый, этидиумбромид, примулин, родамин, берберинсульфат, флуорескамин, ауорофосфин и некоторые другие, избирательно концентрирующиеся на отдельных структурах клетки. Флуорескамин выявляет аминокруппы, этидиумбромид — ДНК, фосфин 3R — липиды. Калькофлуор белый образует соединения с хитином, целлюлозой и используется для учета грибов в почве. Диацетилфлуоресценн дифференцирует живые и мертвые клетки.

Особый интерес представляет флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), образующий связь с белками антител без нарушения их способности соединяться с гомологичными антигенами. Меченные ФИТЦ антитела представляют собой высокочувствительные индикаторы на соответствующие антигены. Антитела получают общепринятыми методами из крови иммунизированных кроликов и затем флуорохромируют. Кроме того, широко используются готовые, меченные флуорохромом определенные антисыворотки, а также готовый комплекс ФИТЦ- γ -глобулин. Иммунофлуоресцентный анализ широко применяется в медицинской и санитарной микробиологии, генетике, систематике, экологии микроорганизмов.

Препараты живых клеток. На предметное стекло в каплю раствора акридина оранжевого в воде или 0,5%-ном NaCl в разведении 1:10 000 вносят исследуемую культуру микроорганизмов и накрывают покровным стеклом. Через 2—10 мин микроскопируют при увеличении объектива 40 \times или 90 \times с вазелиновым маслом.

Препараты фиксированных клеток. На предметном стекле готовят мазок, фиксируют и окрашивают нейтральным или слабокислым раствором акридина оранжевого в разведении 1:10 000 2—4 мин. Затем препарат отмывают от избытка флуорохрома в стоячей или слабопроточной воде в течение 5—10 мин, накрыва-

ют покровным стеклом (при необходимости добавляя каплю воды) и просматривают с объективом 90X.

Иммунофлуоресцентное окрашивание: прямой метод. На предметное стекло помещают суспензию клеток или образец, содержащий искомый микроорганизм, подсушивают и фиксируют нагреванием или другим способом. Препарат окрашивают меченой ФИТЦ антисывороткой, поместив его во влажную камеру (чашка Петри с мокрой фильтровальной бумагой). Время взаимодействия подбирают опытным путем; обычно достаточно 20 мин. Затем препарат отмывают в стоячей или слабопроточной воде 2—3 мин, накрывают покровным стеклом и исследуют с объективом 90X. Так как оболочка клетки непроницаема для антител, они адсорбируются на поверхности клетки, так что возникает характерный «эффект ореола» как один из критериев специфичности. Если в сыворотке есть несвязанный флуорохром, он, проникая в клетку, вызывает ее свечение вследствие неспецифической реакции

Иммунофлуоресцентное окрашивание: непрямой метод. Включает два этапа. Препарат фиксируют нагреванием, наносят каплю нелюминесцирующей гомологичной иммунной сыворотки определенного разведения и оставляют на 20—30 мин во влажной камере. Затем осторожно промывают в течение 5 мин. На втором этапе на препарат наносят каплю меченого антикроличьего γ-глобулина, разведенного до так называемого окрашивающего титра. Время инкубации на втором этапе и окрашивающий титр определяют экспериментально. После этого препарат осторожно промывают и микроскопируют при увеличении 90X. Непрямой метод обладает принципиальным преимуществом, так как, имея лишь одну люминесцирующую сыворотку, можно отыскать большое число разных антигенов, используя стандартные кроличьи сыворотки. При непрямом методе, однако, крайне важен контроль, включающий инкубирование препарата на втором этапе непосредственно с меченой сывороткой; обработку препарата гетерологичной меченой сывороткой; обработку препарата на первом этапе нормальной или гетерологичной сывороткой, не содержащей антител к исследуемому антигену.

Обнаружение мелких колоний микроорганизмов. Мембранный фильтр марки «Синпор» с диаметром пор 1 мкм стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 20 мин. Через фильтр пропускают исследуемый субстрат (воду, почвенную вытяжку) или суспензию микроорганизмов. Фильтр накладывают тыльной стороной на агаровую пластинку с селективной питательной средой и помещают на 5—6 ч в термостат. Затем фильтр с колониями снимают со среды и кладут тыльной стороной на дно чашки Петри, содержащей несколько капель флуорохрома, или диск фильтровальной бумаги, смоченный раствором флуорохрома, например, акридина оранжевого, в разведении 1:5000. Диффундирующий через фильтр флуорохром в течение 5—10 мин окраши-

вает колонии микроорганизмов. При необходимости фильтр накладывают на фильтровальную бумагу, смоченную физиологическим раствором, для удаления избытка флуорохрома. Фильтры просматривают в синем свете. Микроорганизмы остаются живыми и могут быть использованы для дальнейшего выращивания и изучения.

6.4. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Как уже отмечалось (6.1.5.), электронный микроскоп позволяет исследовать только неживые обезвоженные объекты. Способы подготовки микроорганизмов к наблюдению в сканирующем (СЭМ) и трансмиссионном (ТЭМ) электронных микроскопах имеют свои особенности.

6.4.1. Препараты для просвечивающей электронной микроскопии

Приготовление препаратов включает процессы фиксации, обезвоживания, пропитки и заливки специальными смолами.

Фиксация. Микроорганизмы фиксируют раствором глутарового альдегида, раствором оксида осмия или последовательным использованием того и другого. Работу ведут в вытяжном шкафу. Клетки отделяют от среды центрифугированием при 6000 об/мин, промывают фосфатным буфером (0,1 н., рН 7,2) и вновь центрифугируют. 5—10 мг биомассы помещают в 1 мл 2,5%-ного охлажденного раствора глутарового альдегида в том же фосфатном буфере и оставляют на 1—2 ч в темноте при +4°. Глутаровый альдегид сливают, клетки промывают 2 раза фосфатным буфером и после центрифугирования заливают 1%-ным водным раствором OsO₄. Оставляют на 2—16 ч в темноте при +4°. Раствор оксида осмия сливают и клетки промывают 2—3 раза фосфатным буфером, центрифугируя.

Обезвоживание. Осадок после фиксации и промывки фосфатным буфером проводят через растворы этанола возрастающей концентрации, каждый раз центрифугируя суспензию: 30°-ный — 2 раза по 5 мин; 50°-ный — 1 раз 10 мин; 70°-ный — с 3%-ным уранилацетатом, оставляя на ночь; 96°-ный — 2 раза по 10 мин; 100°-ный — 2 раза по 10 мин. На последнем этапе клетки проводят через ацетон 2 раза по 10 мин.

Пропитка смолами. После обезвоживания клетки пропитывают смолами (эпон, аралдит), выдерживая материал в стеклянных бюксах при 37° по 1 ч в системе ацетон: смолы, взятых последовательно в соотношении 3:1, 1:1 и 1:3. Затем клетки переносят в заливочные капсулы и заливают смолами без ацетона. Капсулы выдерживают при комнатной температуре 1 сутки, затем при 37° 1 сутки и при 60° 2 суток. После этого капсулы с включенными в смолы клетками микроорганизмов готовы для заточки и резки на

ультрамикротоме. После нанесения срезов на формваровые сеточки их окрашивают цитратом свинца или уранилацетатом.

6.4.2. Препараты для сканирующей электронной микроскопии: клетки, колонии, споры воздушного мицелия

Подготовка клеток включает три этапа: фиксацию, обезвоживание, напыление металлом.

Фиксация. 20—50 мг сырой биомассы микроорганизмов помещают в 5 мл фосфатного буфера (0,1 н., рН 7,2) в центрифужных пробирках, перемешивают и центрифугируют при 6000 об/мин 5 мин. К осадку добавляют 2 мл глутарового альдегида в 18 мл того же фосфатного буфера, перемешивают и оставляют на 1 ч в темноте. Затем клетки центрифугируют и промывают фосфатным буфером.

Обезвоживание. Процесс обезвоживания проводят, последовательно помещая осадок клеток на 5 мин в водные растворы этанола концентрации 50, 60, 70, 96 и в конце 100°, каждый раз центрифугируя. Полученный осадок переносят в маленькие бюксы, которые оставляют на ночь открытыми в вытяжном шкафу для полного испарения ацетона. Далее проводят досушивание в критической точке.

Напыление металлом. На поверхность поддерживающего столика наносят тонкий слой клея или лака, на который помещают небольшое количество полученного материала. Столики в специальном приборе напыляют металлом в течение 15 мин.

Микроорганизмы для наблюдения в СЭМ можно подготовить на покровном стекле. Культуру или промытые фосфатным буфером клетки наносят на осколок обезжиренного покровного стекла и высушивают на воздухе. Стекло помещают на 1 ч в глутаровый альдегид (2,5%-ный раствор в фосфатном буфере, 0,1 н., рН 7,2) и промывают затем фосфатным буфером. Далее обезвоживают клетки, последовательно помещая стекла в водные растворы этанола (20, 25, 50, 70, 96; 100°) на 15 мин в каждый и в амилацетат или чистый ацетон на 1 ч. Досушивают в критической точке. Сухие мазки готовы для напыления и просмотра в СЭМ.

С целью изучения архитектоники колоний микроорганизмов их выращивают на мембранных фильтрах (Владипор, № 2—5) и проводят фиксацию и обезвоживание в щадящем режиме. Фильтры стерилизуют и помещают на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри, инокулируют культурой в определенном разведении и инкубируют в подходящем режиме. Выросшие колонии подвергают фиксации и обезвоживанию, последовательно помещая фильтры в чашки Петри, крышки которых покрыты внутри фильтровальной бумагой, пропитанной следующими веществами: 25%-ный глутаровый альдегид, на 20—30 мин, безводный ацетон или пропиленоксид, 2 раза по 20 мин. После напыления металлом колонии исследуют в СЭМ.

Колонии микроорганизмов можно также последовательно по 20—30 мин фиксировать 25%-ным глутаровым альдегидом и 1—2%-ным водным раствором оксида осмия и после обезвоживания, заливки смолами и ультратомирования исследовать в ТЭМ.

Экзоспores актиномицетов и грибов готовят к наблюдению в СЭМ следующим образом. К спорносящему воздушному мицелию слегка прикасаются поверхностью поддерживающего столика, покрытой клеем или лаком. Полученный отпечаток подсушивают на воздухе и напыляют металлом. Обращают внимание на расположение и структуру поверхности спор.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ МИКРООРГАНИЗМОВ

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или в питательных средах судят по количеству их клеток или биомассе в единице объема. Методы определения этих показателей могут быть прямыми (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание на весах) или косвенными. Косвенные методы основаны на измерении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (число колоний, выросших после высева суспензии клеток на питательную среду, рассеяние или поглощение суспензией клеток света, содержание в ней белка и др.). Выбор метода зависит от целей исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов. Так, многие методы, используемые для определения числа одноклеточных микроорганизмов, не приемлемы при подсчете многоклеточных (нитчатых, мицелиальных и др.) форм.

При оценке численности микроорганизмов, особенно в естественных субстратах (прежде всего в почве), необходимо помнить, что их клетки часто находятся в прикрепленном (адгезированном) состоянии или в виде микроколоний. Поэтому перед началом подсчета их нужно отделить от частиц субстрата и друг от друга (десорбировать). Выбор метода десорбции (механическое перемешивание суспензии клеток, растирание, обработка ультразвуком, применение поверхностно активных веществ и т. д.) определяется особенностями исследуемого субстрата.

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

7.1.1. Подсчет клеток микроорганизмов под микроскопом

Подсчитать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, капилляры Перфильева, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток в единице объема. Следует помнить, что подсчитываются все клетки, как живые, так и мертвые. Основное ограничение большинства указанных методов — необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

Подсчет клеток в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов — дрожжей, одно-

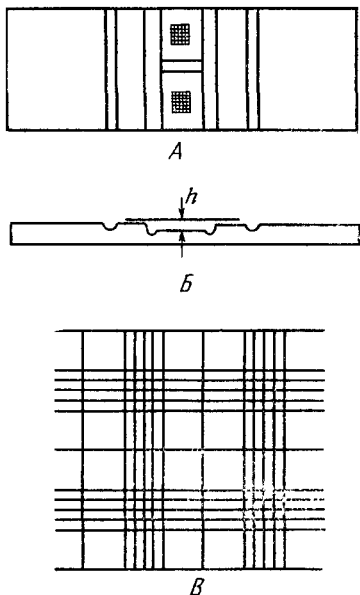


Рис. 55. Счетная камера Горяева—Тома:
 А — вид сверху; Б — вид сбоку; Б' — при малом увеличении микроскопа

тона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящийся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 3—5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости. Подвижные клетки перед заполнением камеры убивают нагреванием или суспендированием в 0,5%-ном водном растворе формалина.

Число клеток подсчитывают с объективом $8\times$ или $40\times$. С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его фокусное расстояние меньше толщины стекла камеры. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом — 10, в противном случае исходную суспензию разводят

клеточных водорослей, конидий грибов и некоторых относительно крупных бактерий. Обычно используют камеру Горяева—Тома (рис. 55), хотя можно применять и другие счетные камеры. Камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. На центральную часть стекла нанесена сетка. Площадь квадрата сетки указана на одной из сторон предметного стекла и соответствует $1/25 \text{ мм}^2$ (большой квадрат) или $1/400 \text{ мм}^2$ (малый квадрат). Часть предметного стекла, на которой нанесена сетка, на 0,1 мм ниже двух других сторон. Это глубина камеры; она всегда указывается на предметном стекле.

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона.

водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.

Точность определения зависит от того, насколько плотно пришлифовано покровное стекло к поверхности камеры, поэтому подсчет клеток повторяют 3—4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{hS} n,$$

где M — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число клеток в квадрате сетки; h — высота камеры в мм; S — площадь квадрата сетки в мм²; 10^3 — коэффициент перевода см³ в мм³; n — разведение исследуемой суспензии.

Подсчет клеток в капиллярах Перфильева. Для изучения и подсчета микроорганизмов в естественных субстратах иногда применяют капилляры Перфильева. Они имеют прямоугольное сечение и по принципу подсчета аналогичны счетной камере. При погружении капилляра в субстрат (ил, почву и т. д.) он заполняется в силу своих капиллярных свойств. Затем капилляр помещают на предметное стекло, заливают конец расплавленным парафином и подсчитывают клетки, используя объективы 40×, 90× или фазово-контрастное устройство.

Длина отрезка капилляра соответствует диаметру поля зрения при данном увеличении микроскопа. Для получения достоверного результата подсчитывают клетки в 50—100 полях зрения. Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата определяют по формуле

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{hld} n,$$

где M — количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a — среднее число клеток в капилляре, длиной в диаметр поля зрения; h — высота капилляра в мм; l — ширина капилляра в мм; d — диаметр поля зрения (длина капилляра) при данном увеличении микроскопа в мм; 10^3 — коэффициент перевода см³ в мм³; n — разведение исследуемого субстрата.

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского—Брида). Метод широко используется для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах — почве, загрязненных водах, молоке, в оптически непрозрачных питательных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, соевую муку. Преимущество метода заключается также в том, что фиксированные окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время.

Приготовление препарата сводится к следующему. Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечен прямоугольник площадью 4 или 6 см². Затем на стекло из микропипетки наносят точно измеренный объем исследуемой суспензии (0,01, 0,02 или 0,03 мл) и каплю 0,03—0,1%-ного водного раствора агара. Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют 10—20 мин 96°-ным спиртом и окрашивают 1—2 мин фуксином Циля или любым другим красителем. Краситель сливают, препарат промывают, последовательно погружая стекло в 4—5 стаканов с водой (промывать препарат под струей водопроводной воды не следует), и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

Количество клеток подсчитывают с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Для максимального использования оптических возможностей микроскопа рекомендуется иммергировать конденсор. Следует иметь в виду, что использование ахроматов не дает одинаково четкой картины в центре поля зрения и по его краям, что затрудняет подсчет. Правила подсчета в квадратах окулярной сетки те же, что и при подсчете клеток в квадратах сетки счетной камеры. 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, содержащихся в 1 мл исследуемого субстрата, вычисляют по формуле

$$M = \frac{aS}{sV} n,$$

где M — количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a — среднее число клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения); s — площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) в мкм²; V — объем нанесенной на стекло суспензии в мл; S — площадь приготовленного мазка в мкм²; n — разведение исследуемого субстрата.

Площадь квадрата сетки или поля зрения определяют с помощью объект-микрометра. Последний помещают на столик микроскопа вместо препарата и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения (см. гл. 6). Площадь поля зрения вычисляют по формуле $s = \pi r^2$.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах. Этот метод рекомендуется использовать для определения численности микроорганизмов в субстратах с низкой плотностью клеток. Его применяют при определении количества микроорганизмов в различных водоемах, при санитарно-бактериологических и некоторых других

исследованиях. Фильтрация пробы определенного объема (от нескольких миллилитров до десятков литров) позволяет сконцентрировать на поверхности фильтра содержащиеся в пробе клетки микроорганизмов. Затем их окрашивают и подсчитывают.

Для фильтрации выбирают фильтр, который задерживает микроорганизмы, находящиеся в исследуемом субстрате. Характеристика мембранных фильтров приведена в гл. 3. Перед использованием каждую партию фильтров необходимо проверять, так как иногда они бывают сильно загрязнены бактериями. Для этого 3—5 фильтров кипятят в дистиллированной воде, окрашивают карболовым эритрозинном, как указано ниже, и просматривают под микроскопом. Фильтры с большим загрязнением микроорганизмами для подсчета клеток не используют. Пригодные для работы фильтры кипятят в дистиллированной воде для удаления воздуха и остатков растворителей; воду следует 2—3 раза сменить. Кипячение не должно быть слишком бурным, иначе фильтры будут скручиваться. После этого фильтр матовой стороной вверх помещают на пористую пластинку специального держателя и пропускают через него точно измеренный объем исследуемой пробы. Подробно о технике фильтрации через мембранные фильтры см. гл. 3.

Чем больше плотность клеток в исследуемом материале, тем меньше должен быть фильтруемый объем, и наоборот. Клетки микроорганизмов, осевшие на фильтре, окрашивают карболовым эритрозинном. Для этого фильтр помещают нижней стороной в чашку Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную красителем, чашку закрывают крышкой и оставляют на 3—5 ч или даже на сутки. Для равномерного окрашивания клеток мембранный фильтр должен плотно прилегать к бумажному фильтру с эритрозинном. Затем мембранный фильтр отмывают от красителя, перекидывая его в чашки Петри с фильтровальной бумагой, обильно смоченной дистиллированной водой, до тех пор, пока он не перестанет окрашивать влажную фильтровальную бумагу. После отмывания фильтр высушивают на воздухе и готовят препарат для микроскопирования. На предметное стекло капают иммерсионное масло и помещают на него окрашенный мембранный фильтр так, чтобы клетки микроорганизмов были сверху. На поверхность мембранного фильтра наносят еще каплю иммерсионного масла и покрывают фильтр покровным стеклом.

Количество клеток микроорганизмов подсчитывают с иммерсионным объективом 90X в квадратах окулярной сетки или в поле зрения микроскопа. Правила подсчета аналогичны тем, которые изложены для метода Виноградского. Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле

$$M = \frac{aF \cdot 10^6}{s \cdot V},$$

где M — количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a — среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле

зрения); F — площадь мембранного фильтра в мм^2 ; V — объем (мл) профильтрованной жидкости; 10^6 — коэффициент перевода мм^2 в мкм^2 ; s — площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения).

При выявлении и количественном учете микроорганизмов широко применяют люминесцентную микроскопию (см. гл. 6). Препараты микроорганизмов готовят непосредственно из исследуемой суспензии и ее разведений либо концентрируют клетки на специально обработанных нефлуоресцирующих фильтрах. Препараты и фильтры с микроорганизмами обрабатывают акридином оранжевым или другими красителями. Принципы подсчета при люминесцентной и светлопольной микроскопии одинаковы, однако окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата и хорошо отличимы от небиологических объектов (частиц ила, почвы и т. д.). Это позволяет вести их подсчет более точно.

Люминесцентная микроскопия дает также возможность выявить и оценить численность отдельных групп микроорганизмов в исследуемой пробе. Это достигается в результате использования специальных флуорохромов (например, калькофлуора белого — для выявления грибов), методов иммунофлуоресценции и др.

7.1.2. Определение числа клеток микроорганизмов высевом на питательные среды

В отличие от подсчета микроорганизмов под микроскопом этот метод дает возможность определить только число жизнеспособных клеток в популяции. Поскольку сред, пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует, метод посева дает возможность определить число микроорганизмов, способных расти на среде данного состава, но не позволяет учесть те микроорганизмы, которые не растут или растут крайне медленно. Это важно помнить при анализе таких естественных субстратов, как почва, вода и т. п.

Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха). Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного учета микроорганизмов, проведенного методом Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных единицах — так называемых колониеобразующих единицах (КОЕ).

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

Приготовление разведений. Численность популяции микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или 0,85%-ном растворе NaCl (физрастворе). В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, например 10, что уменьшает вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды — это 1-е разведение, 10^{-1} . Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняют 3—5 раз, затем той же пипеткой отбирают 1 мл полученной суспензии и переносят во 2-ю пробирку — получают 2-е разведение (10^{-2}). Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно она тем больше, чем больше плотность популяции.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

Посев. Высеять суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом (рис 56) разливают расплавленную, чаще всего агаризованную, питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15—20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушивать для удаления конденсационной воды.

Среду можно подсушить, поместив чашки в термостат на 2—3 суток крышками вниз. После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стерильным 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. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило 0,1, 0,5 или 1,0 мл) исходной суспензии или разведения вносят в расплавленную и остуженную до 48—50° агаризованную среду, тщательно перемешивают и затем немедленно выливают в чашку Петри. Среде дают застыть. В случае глубинного посева поль-

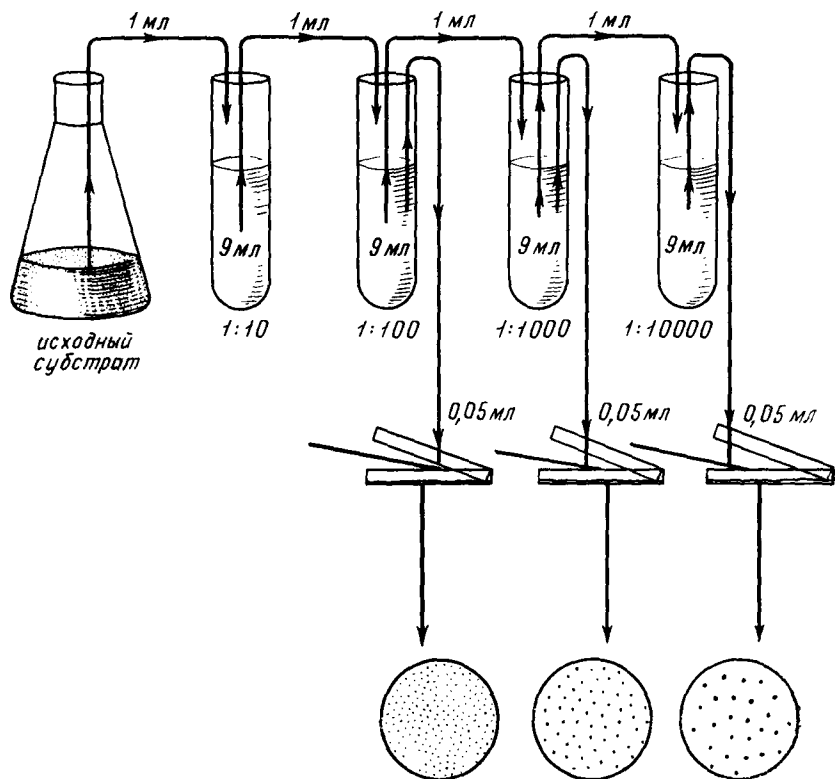


Рис. 56. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов шпателем

зуются средой, разлитой в пробирки. При больших масштабах работы среду по пробиркам не разливают, а поступают следующим образом. По 1 мл из соответствующего разведения переносят стерильной пипеткой в 2—4 стерильные чашки Петри. Затем заливают чашки 15—20 мл расплавленной и остуженной до 48—50° плотной средой и тщательно смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после чего чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания. Когда среда застынет, чашки Петри в перевернутом виде помещают в термостат.

Для определения количества клеток анаэробных микроорганизмов чашки Петри с плотной средой после посева помещают в анаэростаты. Иногда для определения численности анаэробов плотную среду после засева оставляют в пробирках. Поверхность застывшей среды заливают парафином. Для лучшего рассмотрения колоний микроорганизмов среды в этом случае рекомендуется осветлять. Определение численности экстремальных анаэробов требует применения техники Хангейта (см. гл. 4).

Подсчет выросших колоний. Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 2—15 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Иногда для подсчета колоний используют специальные полуавтоматические счетчики.

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

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле

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

где M — количество клеток в 1 мл; a — среднее число колоний при высеве разведения, из которого сделан высев; V — объем суспензии, взятый для посева, в мл; 10^n — коэффициент разведения.

Определение количества клеток высевам в жидкие среды (метод предельных разведений). Метод используют для подсчета микроорганизмов, которые плохо или совсем не растут на плотных питательных средах. В пробирки с жидкой средой вносят строго измеренный объем из различных разведений исследуемого субстрата. После инкубации, исходя из числа пробирок, в которых наблюдался или отсутствовал рост, рассчитывают по табл. 11 наиболее вероятное число клеток, содержащихся в 1 мл исследуемого субстрата. Таким образом, определение количества микроорганизмов методом предельных разведений включает приготовление разведений, посев в жидкую среду, регистрацию наличия или отсутствия роста после инкубации и расчет наиболее вероятного числа клеток в единице объема исходного субстрата.

Приготовление разведений. Разведения исходной суспензии готовят, как и для чашечного метода.

Посев в среду и регистрация результатов. Стерильную среду, обеспечивающую рост микроорганизмов, численность которых хотят определить, предварительно разливают в пробирки (колбы) и стерилизуют. В пробирки (колбы) следует наливать одинаковый объем среды. Посев проводят из каждого разведения или из 4—5 последних, причем каждое разведение высевают в 3—5 параллельных пробирок. Количество посевного материала везде одинаково и, как правило, составляет 1 мл. Засеян-

Наиболее вероятное количество клеток микроорганизмов в единице объема исходной суспензии (по Мак-Креди)

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при засеве параллельных пробирок в числе				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при засеве параллельных пробирок в числе				Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при засеве параллельных пробирок в числе			
	2	3	4	5		2	3	4	5		2	3	4	5
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
000	0,0	0,0	0,0	0,0	222	110,0	3,5	2,0	1,4	433	—	—	30,0	—
001	0,5	0,3	0,2	0,2	223	—	4,0	—	—	434	—	—	35,0	—
002	—	—	0,5	0,4	230	—	3,0	1,7	1,2	440	—	—	25,0	3,5
003	—	—	0,7	—	231	—	3,5	2,0	1,4	441	—	—	40,0	4,0
010	0,5	0,3	0,2	0,2	232	—	4,0	—	—	442	—	—	70,0	—
011	0,9	0,6	0,5	0,4	240	—	—	2,0	1,4	443	—	—	140,0	—
012	—	—	0,7	0,6	241	—	—	3,0	—	444	—	—	160,0	—
013	—	—	0,9	—	300	—	2,5	1,1	0,8	451	—	—	—	4,0
020	0,9	0,6	0,5	0,4	301	—	4,0	1,6	1,1	450	—	—	—	5,0
021	—	—	0,7	0,6	302	—	6,5	2,0	1,4	500	—	—	—	2,5
022	—	—	0,9	—	303	—	—	2,5	—	501	—	—	—	3,0
030	—	—	0,7	0,6	310	—	4,5	1,6	1,1	502	—	—	—	4,0
031	—	—	0,9	—	311	—	7,5	2,0	1,4	503	—	—	—	6,0
040	—	—	0,9	—	312	—	11,5	3,0	1,7	504	—	—	—	7,5
041	—	—	1,2	—	313	—	16,5	3,5	2,0	510	—	—	—	3,5
100	0,6	0,4	0,3	0,2	320	—	9,5	2,0	1,4	511	—	—	—	4,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
101	1,2	0,7	0,5	0,4	321	—	15,0	3,0	1,7	512	—	—	—	6,0
102	—	1,1	0,8	0,6	322	—	20,0	3,5	2,0	513	—	—	—	8,5
103	—	—	1,0	0,8	323	—	30,0	—	—	520	—	—	—	5,0
110	1,3	0,7	0,5	0,4	320	—	25,0	3,0	1,7	521	—	—	—	7,0
111	2,0	1,1	0,8	0,8	331	—	45,0	3,5	2,0	522	—	—	—	9,5
112	—	—	1,1	0,8	332	—	110,0	4,0	—	523	—	—	—	12,0
113	—	—	1,3	—	333	—	140,0	5,0	—	525	—	—	—	15,0
120	2,0	1,1	0,8	0,6	340	—	—	3,5	2,0	524	—	—	—	17,5
121	3,0	1,5	1,1	0,8	341	—	—	4,5	2,5	530	—	—	—	8,0
122	—	—	1,3	1,0	350	—	—	—	2,5	531	—	—	—	11,0
123	—	—	1,6	—	400	—	—	2,5	1,3	532	—	—	—	14,0
130	—	1,6	1,1	0,8	401	—	—	3,5	1,7	533	—	—	—	17,5
131	—	—	1,4	1,0	402	—	—	5,0	2,0	534	—	—	—	20,0
132	—	—	1,6	—	403	—	—	7,0	2,5	535	—	—	—	25,0
140	—	—	1,4	1,1	410	—	—	3,5	1,7	540	—	—	—	13,0
141	—	—	1,7	—	411	—	—	5,5	2,0	541	—	—	—	17,0
200	2,5	0,9	0,6	0,5	412	—	—	8,0	2,5	542	—	—	—	25,0
201	5,0	1,4	0,9	0,7	413	—	—	11,0	—	543	—	—	—	30,0
202	—	2,0	1,2	0,9	414	—	—	14,0	—	544	—	—	—	35,0
203	—	—	1,6	1,2	420	—	—	6,0	2,0	545	—	—	—	45,0
210	6,0	1,5	0,9	0,7	421	—	—	9,5	2,5	550	—	—	—	25,0
211	13,0	2,0	1,3	0,9	423	—	—	17,0	—	551	—	—	—	35,0
212	20,0	3,0	1,6	1,2	422	—	—	13,0	3,0	552	—	—	—	60,0
213	—	—	2,0	—	424	—	—	20,0	—	553	—	—	—	90,0
220	25,0	2,0	1,3	0,9	430	—	—	11,5	1,5	554	—	—	—	100,0
221	70,0	3,0	1,6	1,2	431	—	—	16,5	3,0	555	—	—	—	180,0
					432	—	—	20,0	4,0					

ные пробирки помещают в термостат. Время инкубации колеблется от 2 до 15 суток и зависит от скорости роста микроорганизмов, численность которых определяют. После инкубации регистрируют рост микроорганизмов, используя различные показатели: помутнение среды, образование пленки, осадка, газа или накопление в среде определенных продуктов метаболизма.

Наиболее вероятное количество клеток в единице объема рассчитывают по таблице Мак-Креди (табл. 11), разработанной на основании методов вариационной статистики. Для этого первоначально составляют числовую характеристику, которая включает три цифры. Первая цифра слева показывает число пробирок в том последнем разведении, при высеве из которого во всех засеянных пробирках был отмечен рост. Две следующие цифры обозначают число пробирок, в которых отмечен рост микроорганизмов при засеве их из двух последующих разведений. Затем по таблице находят наиболее вероятное число микроорганизмов, соответствующее данному значению числовой характеристики. Количество микроорганизмов в 1 мл (1 г) исходного субстрата соответствует этому числу, умноженному на то разведение, которое было взято для получения первой цифры числовой характеристики.

Пример 1

Разведение исходной суспензии	0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Число засеянных пробирок	4	4	4	4	4
Число пробирок, в которых обнаружен рост	4	4	3	1	0
Числовая характеристика	431	—	—	—	—
Наиболее вероятное число микроорганизмов	16,5	—	—	—	—
Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	165				

Пример 2

Разведения исходной суспензии	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Число засеянных пробирок	3	3	3	3	3
Число пробирок, в которых обнаружен рост	3	3	2	0	0
Числовая характеристика	320	—	—	—	—
Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов	9,5	—	—	—	—
Количество клеток микроорганизмов в 1 мл исходной суспензии	$9,5 \cdot 10^3$				

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Точность любого метода определения числа микроорганизмов ограничена ошибкой метода, которая возникает вследствие случайного распределения клеток в суспензии и является результатом ограниченного числа подсчитываемых клеток, а также техническими ошибками, т. е. неточностью в приготовлении разведений, неправильным монтажом камеры, повторным учетом одной и той

же клетки (колонии) и т. д. Ошибки метода неизбежны, тогда как технические ошибки зависят главным образом от качества работы исследователя. Необходимо помнить, что статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке. Чашечный метод и метод предельных разведений требуют особой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки, пробирки и среды от заражения микроорганизмами из воздуха, так как каждая случайно попавшая клетка может заметно завесить число микроорганизмов в исследуемом субстрате.

7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ВЗВЕШИВАНИЕМ

Этот метод широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидких питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в суспензию. Метод не может быть использован при культивировании микроорганизмов на средах, в состав которых входят соединения, не растворимые в воде.

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций: доведения массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определения их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. В последнем случае первый этап отпадает; достаточно только взвесить центрифужную пробирку (фильтр), но не доводить ее массу до постоянного значения. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения. С этой целью фильтры, предварительно положенные в открытую чашку Петри, или центрифужные пробирки помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1—2 ч при температуре 80—85° и 90—100° соответственно. Затем чашку Петри с фильтрами или центрифужные пробирки вынимают из сушильного шкафа и переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaCl_2) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры (центрифужные пробирки) взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения, т. е. колебания в ее определениях не превысят $\pm 0,0001$ г.

Отделение микроорганизмов от среды возможно центрифугированием или фильтрованием. Центрифугированием

отделяют обычно бактерии. Для этого в центрифужную пробирку наливают точно измеренный объем тщательно перемешанной жидкой культуры, который в зависимости от ее плотности колеблется от 5 до 20 мл. Время центрифугирования и число оборотов зависят от размеров клеток. Чем они меньше, тем больше требуется оборотов и тем продолжительнее должно быть время центрифугирования. Чаще всего центрифугируют 15—20 мин при 5—10 тыс. оборотов в мин. После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок промывают слегка подкисленной дистиллированной водой (1 мл концентрированной HCl на 1 л воды) и снова центрифугируют при том же числе оборотов. Супернатант сливают тотчас после остановки центрифуги. В противном случае часть осадка может быть потеряна.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры, от 5 до 10 мл. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранного фильтра должны быть меньше величины клеток, биомассу которых определяют (характеристику фильтров см. гл. 3). Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, колбу подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной дистиллированной водой. Подробно порядок работы с мембранными фильтрами см. гл. 3.

Определение биомассы. Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, который использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле

$$M = \frac{(A-B)1000}{V},$$

где M — сухая биомасса в г/л; A — масса центрифужной пробирки (фильтра) с осадком в г; B — масса центрифужной пробирки (фильтра) без осадка в г; V — объем культуральной жидкости, взятый для центрифугирования (фильтрования) в мл. Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

73. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК И БИОМАССЫ НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Оптический (нефелометрический, турбидиметрический) метод определения биомассы нашел широкое применение в лабораторных микробиологических исследованиях, поскольку позволяет

быстро и довольно точно определить концентрацию клеток в суспензии или культуральной жидкости.

В основе метода лежит измерение уменьшения количества света при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно обусловлено преимущественно рассеянием света клетками и пропорционально их концентрации. Величина этого показателя зависит от многих факторов (формы и размеров клеток, оптических свойств культуральной среды, длины волны падающего света и т. д.). Поэтому нефелометрический метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает равномерное помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клеток, образованием мицелия, пленок или других скоплений.

Питательная среда для культивирования микроорганизмов, в которой предполагается определять число клеток по светорассеянию, должна быть оптически прозрачной. Если мутность среды связана с выпадением в осадок некоторых солей, чаще всего фосфатов, то перед измерением светорассеяния ее подкисляют несколькими каплями концентрированной соляной кислоты.

Изменение интенсивности света при прохождении через суспензию клеток измеряют с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или спектрофотометра, выбирая длину волны (обычно в интервале 540—650 нм), при которой поглощение света данной суспензией клеток является минимальным. Так, рассеяние света, вызываемое суспензией клеток в мясо-пептонном бульоне или сусле, наиболее удобно измерять с красным фильтром, при котором оптическая плотность таких сред минимальна. При высоких концентрациях клеток в культуральной среде происходит вторичное рассеяние света, что приводит к получению заниженных результатов. Поэтому суспензии больших плотностей перед измерением светорассеяния следует разводить средой или водой. Разбавление проб одной и той же культуры разными жидкостями недопустимо, так как набухание и сжатие клеток влияет на величину светорассеяния.

Правила работы на фотоэлектроколориметре и порядок измерения величины светорассеяния подробно изложены в инструкции, прилагаемой к прибору.

В некоторых случаях плотность клеточной суспензии выражают в показаниях нефелометра. Однако чаще строят калибровочные кривые зависимости между величиной светорассеяния и числом клеток или сухой биомассой в единице объема. Для построения калибровочной кривой поступают следующим образом. Измеряют величину светорассеяния суспензий с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют одним из применяемых методов количество клеток или биомассу. Полученную зависимость выражают графически, откладывая на оси ординат показания ФЭК, а на оси абсцисс — количество клеток, содержащихся в 1,0 мл суспензии, или биомассу в г/л. Для каждого микроорганизма следует строить свою калибровочную кривую.

7.3.1. Стандарты мутности и их применение

В ряде случаев количество клеток в суспензии бывает достаточно определить визуально путем сравнения со стандартом мутности. Стандарты мутности, выпускаемые государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, представляют собой взвесь частиц стекла пирекс в дистиллированной воде. За единицу стандарта мутности общего назначения условно принята мутность суспензии в физиологическом растворе бактерий — возбудителей тифа с концентрацией клеток 100 млн/мл. Стандарт мутности включает 4 эталона на 10, 11, 9 и 5 единиц, что соответствует содержанию $1 \cdot 10^9$; $1,1 \cdot 10^9$; $0,9 \cdot 10^9$ и $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл взвеси. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают их в отраженном и проходящем свете на фоне белого листа бумаги, в центре которого нанесено несколько черных линий. Эталоны 9 и 11 являются вспомогательными и позволяют более четко сравнить мутность исследуемой суспензии с эталоном. Стандартизация мутности суспензии бактерий (особенно часто в случае тест-организмов) имеет существенное значение при приготовлении посевного материала в серийных опытах, например, при определении антибиотической активности препаратов методом диффузии в агар.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

8.1. МЕТОДЫ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК

В большинстве экспериментов для выделения и определения внутриклеточных компонентов применяют различные методы разрушения микроорганизмов. Это могут быть ручные и механические гомогенизаторы, растирание клеток с абразивами, растирание замороженных клеток, перемешивание биомассы со стеклянными бусами. Наиболее полное разрушение клеток достигается в случае применения декомпрессионных методов (Х-пресс, Френч-пресс) или ультразвука. Реже применяют осмотический шок и метод замораживания-оттаивания. Описаны также комбинированные методы разрушения микроорганизмов, сочетающие обработку клеточных стенок ферментами с последующим осмотическим шоком полученных сферопластов (протопластов) или растиранием их в гомогенизаторе.

В зависимости от вида микроорганизма применяют различные способы их отделения от среды. Такие способы включают использование сепараторов для крупных микроорганизмов, осаждение их фильтрованием через ткань (грибной мицелий) и применение различного рода центрифуг, позволяющих осаждать клетки с охлаждением или без него. В зависимости от величины объектов, целей эксперимента и термолабильности выделяемых структур применяют низкоскоростное или высокоскоростное центрифугирование в периодическом или непрерывных режимах. Для крупных и тяжелых клеток бывает достаточным короткое осаждение при 2—3 тыс. *g*, тогда как мелкие и легкие клетки требуют длительного центрифугирования при 15—20 тыс. *g*. Необходимо учитывать возможный нагрев биологического материала при высокоскоростном центрифугировании объектов без соответствующего охлаждения.

Отделенную от культуральной жидкости биомассу 2—3 раза промывают для удаления следов среды продуктов метаболизма, суспендируя каждый раз в свежей среде (обычно без источника углерода) или в буферном растворе. Экстракт, полученный после разрушения клеток, отделяют от неразрушенных клеток и крупных обломков центрифугированием с охлаждением от 10 мин при 15 тыс. *g* до 1 ч при 40 тыс. *g* в зависимости от целей эксперимента. Супернатант, называемый грубым, или исходным, экстрактом, можно затем повторно центрифугировать при 150—200 тыс. *g*

в течение 1,5—2 ч для получения прозрачного экстракта клеток и осадка клеточных мембран. Если при этом исходный экстракт содержит плавающие на поверхности частицы, их можно удалить фильтрованием через ткань или стеклянную вату.

8.1.1. Гомогенизация

Гомогенизацию можно использовать для микроорганизмов с тонкой клеточной стенкой, не имеющих клеточной стенки или для животных и некоторых растительных клеток. Порции биомассы, суспендированные в буферном растворе (3—5 объемов), переносят в ручной гомогенизатор и пропускают через него биомассу 10—20 раз. При использовании механических гомогенизаторов с быстро вращающимися ножами («блендеров») время обработки обычно не превышает 1—2 мин с интервалами по 20 с промежуточным охлаждением биомассы на льду.

Зазор между стеклянной стенкой и тефлоновым пестиком ручного гомогенизатора должен быть в пределах 0,35—0,70 мм. Механический гомогенизатор можно охлаждать в воде со льдом для поддержания низкой температуры при разрушении клеток (в этом случае резко снижается активность внутриклеточных протеиназ) или проводить эксперимент в холодной комнате. Степень разрушения контролируют в фазово-контрастном микроскопе или по белку, высвобожденному из клеток.

8.1.2. Растирание клеток

Одним из простых, но достаточно надежных способов разрушения клеток микроорганизмов является растирание их суспензий с абразивами. Для этой цели применяют промытый кварцевый песок, толченное кварцевое стекло, пудру окиси алюминия или другие твердые вещества. При разрушении к клеточной пасте постепенно добавляют двойное количество (по массе) абразива и растирают с силой до появления щелкающих звуков (обычно 10—15 мин после добавления последней порции абразива). В процессе растирания клеточная паста подвергается нагреву, поэтому дно ступки следует охлаждать (на лотке со льдом).

Особо следует отметить способ растирания клеток микроорганизмов, замороженных в жидком азоте, где в качестве разрушающего абразива выступают кристаллики льда, образовавшиеся при быстром замораживании биомассы (вкапывание суспензии в буфере в толстостенную ступку с налитым жидким азотом). При растираниях применяют обычно фарфоровые ступки и пестики. Время обработки зависит от толщины клеточных стенок разрушаемого микроорганизма. Этими способами можно растирать до 30 г сырых клеток за один прием. После растираний к полученной массе добавляют равный объем буферного раствора и центрифугируют для удаления абразивов, неразрушенных клеток и крупных их обломков.

8.1.3. Разрушение со стеклянными бусами

Данный метод можно применять даже для разрушения клеточных стенок дрожжей, у которых она очень прочная, поскольку он основан на механическом растирании клеток, попадающих между двумя мелкими стеклянными шариками, вращающимися с большой скоростью в механических мельницах. Малые порции биомассы можно разрушать и в пробирке, используя пробирочный смеситель («вортекс»). Для больших порций клеток необходимо применять специальные механические смесители («мельницы»).

Отмытые клетки ресуспендируют в равном объеме буфера и помещают в прочную центрифужную пробирку с навинчивающейся пробкой для предотвращения вытекания жидкости при встряхивании. В пробирку добавляют 1—3 г охлажденных стеклянных шариков на каждый грамм клеточной массы и встряхивают на смесителе с максимальной скоростью 3—5 раз в течение 1 мин. В интервалах суспензию охлаждают на льду. Для микроколичеств применяют пробирки Эппендорф.

Стеклянные шарики перед опытом отмывают концентрированной соляной кислотой (или хромовой смесью), водопроводной, а затем дистиллированной водой до нейтральной реакции и высушивают в сушильном шкафу. К недостаткам метода относится сильный разогрев содержимого при встряхивании.

8.1.4. Обработка ультразвуком

Ультразвук разрушает микроорганизмы в результате создания высокой степени вибрации и вследствие этого происходит механический разрыв клеток. Для достижения максимального эффекта необходимо применять высокую мощность излучателя и тщательно настраивать его в резонанс с пробой. Следует контролировать уровень пенообразования и перемешивания при обработке, поскольку интенсивное пенообразование приводит к денатурации белков в образующихся тонких пленках на разделе фаз жидкость/газ. Внутренние структуры клеток при этом также подвержены разрушению.

Кончик пестика излучателя должен быть опущен в обрабатываемую суспензию на глубину 1—2 см. Перед началом обработки излучатель должен быть настроен в резонанс при выбранной мощности на порции подвергаемой обработке пробы или другой сходной по вязкости суспензии в сосуде, используемом для озвучивания. Обычно обработку проводят в пластиковых (полиэтиленовых) центрифужных стаканах, но можно использовать и стеклянные стаканы или стаканы из нержавеющей стали. Необходимым условием является строгий контроль за нагревом излучателя и температурой материала. Излучатель охлаждают холодной проточной водопроводной водой, а пробу — в воде со льдом.

Клетки для разрушения суспендируют в двух или более объемах соответствующего буфера (см. Приложение) и охлаждают на

льду. Время облучения варьируют от 2 до 15 мин, однако интервалы непрерывной работы обычно не превышают 30 с. В перерывах между разрушениями пробу и излучатель охлаждают ледяной водой. Степень и полноту разрушения контролируют микроскопированием суспензии. За одну обработку можно разрушить примерно 1 г сухой биомассы.

Описанным методом можно разрушать как многие грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, но клетки актиномицетов, дрожжей и других грибов таким методом разрушаются с трудом. Иногда для усиления эффекта ультразвуковой обработки к суспензиям клеток добавляют кварцевый песок, стеклянные бусы малого диаметра или пудру окиси алюминия.

8.1.5. Френч-пресс

Ячейка Френч-пресса (Френч-пресс) предназначена для разрушения микроорганизмов, основанного на перепаде давления в пробе от высокого (550—1400 атм) к атмосферному. Быстрое изменение давления взрывает клетки изнутри и таким образом разрушает их. Метод наиболее применим к суспензиям объемами от 10 до 30 мл; разрушение меньших объемов сложно технически, а больших — занимает много времени. Время, требуемое для разрушения одной порции клеток небольшого объема, обычно не превышает 10—15 мин. В перерывах необходимо тщательно промывать ячейку от предыдущей пробы и постоянно контролировать состояние полиэтиленового шарика, регулирующего на ячейке степень перепада давления.

Перед разрушением клеточную пасту смешивают с буферным раствором в соотношении от 1:1 до 1:4 г/мл. Суспензию помещают в ячейку и ставят в гидравлический пресс под давление. Медленным открыванием клапана устанавливают требуемую скорость вытекания разрушенного гомогената (обычно 1 капля/с). Для некоторых микроорганизмов необходима двойная или даже тройная обработка, чтобы достичь необходимую степень разрушения. Ячейку перед заполнением суспензией необходимо охлаждать в ледяной воде. Степень разрушения контролируют микроскопированием или по увеличению вязкости жидкости (в результате выхода ДНК).

8.1.6. X-пресс

Разрушение клеток с применением X-пресса основано на том же принципе, что и на Френч-прессе, за исключением состояния разрушаемой суспензии. Перед разрушением приготовленную суспензию клеток в буфере замораживают в ячейке при -70° и затем продавливают через тонкую фильеру с помощью гидравлической системы. Микроорганизмы при этом подвергаются перепаду давления от 500 до 1000 атм и дополнительно абразивному действию кристалликов льда внутри клеток. Под действием давления

(обычно это усилие до 20 т на шкале гидравлического пресса) происходит постепенный разогрев замороженного образца. Когда температура суспензии поднимается до $-10...-15^{\circ}$, начинается продавливание пробы через фильеру. На этом этапе для максимального разрушения необходимо поддерживать давление по манометру на уровне 10—15 т. О конце процесса судят по степени вхождения поршня в ячейку. Этим методом можно разрушить за один прием до 10 г сырых клеток (количество зависит от размера ячейки для разрушения). Метод не удобен для многократного разрушения клеток, поскольку приходится замораживать и оттаивать ячейку. Обычно время разрушения пробы не превышает 15—20 мин.

8.1.7. Лизис клеток с применением ферментов

Разрушение (лизис) клеточных стенок с применением детергентов и ферментов проводят обычно с небольшими порциями биомассы, причем эти методы дают более стандартную обработку для каждой клетки в суспензии, так как концентрации детергентов и ферментов практически одинаковы в любой порции пробы. Как правило, время лизиса не превышает 15—30 мин. Рассмотрим этот метод на примере *Escherichia coli*. Для лизирования клетки суспендируют в ТЕ-буфере (50 мМ *трис*-HCl, pH 8,0 и 10 мМ ЭДТА) из расчета 3 мл буфера на 1 г сырой биомассы и нагревают до 37° . Добавляют 1 мл раствора лизоцима (свежеприготовленный раствор в ТЕ-буфере, 10 мг/мл) на каждые 5 мл суспензии или эквивалентное количество сухого лизоцима и инкубируют 10—20 мин при 37° с легким покачиванием. Быстрее клетки лизируются при повышении действующей концентрации лизоцима до 10 мг/мл. В таких условиях удовлетворительного лизиса можно достичь в течение 5 мин даже при 4° .

Для получения сферопластов дрожжей суспензии их клеток могут быть подвергнуты лизису с помощью препарата ферментов, выделенных из содержимого желудка виноградной улитки. Такой «улиточный фермент» в течение короткого времени при $37-40^{\circ}$ лизирует, например, клеточную стенку дрожжей рода *Saccharomyces*. Препарат фермента готовят в лаборатории из свежесобранных улиток и хранят в замороженном состоянии, используя по потребности.

8.1.8. Лизис клеток с помощью детергентов

Это — наиболее мягкий и быстрый способ разрушения клеток по сравнению с другими методами (занимает от 20 до 90 мин), однако применим лишь для микроорганизмов, лишенных клеточной стенки. Перед лизисом клетки промывают несколько раз забуференным солевым раствором (например, 10 мМ *трис*-HCl, pH 7,5 с 150 мМ NaCl). После последнего центрифугирования биомассу суспендируют до плотности 10^7-10^8 кл/мл или 3—4 мг

сухих клеток на 1 мл в том же буфере, с добавлением 0,1—0,3% тритона X-100. Содержимое перемешивают и инкубируют на льду от 10 до 90 мин. Для стабилизации белков в экстракт добавляют 0,2 объема 50%-ного глицерола. Вместо тритона X-100 могут быть использованы и другие неионные детергенты.

8.1.9. Лизис клеток в присутствии органических растворителей

Лизирование клеток органическими растворителями обычно применяют для микроорганизмов, осажденных на фильтрах с целью проведения реакций с антителами или гибридизаций с пробами нуклеиновых кислот. Для проведения такой обработки чаще всего используют невысокие концентрации толуола (0,1—1,0%) в соответствующем буфере.

8.1.10. Лизис осмотическим шоком

Этот метод применим для клеток с тонкой стенкой или лишенных ее, а также для лизирования протопластов и сферопластов микроорганизмов. «Нагруженные» высокой концентрацией соли или углеводов клетки подвергают ферментативному лизису в присутствии лизоцима и затем разводят в 10—50 раз дистиллированной водой. Действующие концентрации в значительной степени зависят от свойств исследуемого внутриклеточного фермента, вида микроорганизма, соединения, примененного для создания высокого осмотического давления внутри клеток и других факторов.

8.1.11. Лизис с помощью замораживания оттаивания

Этот метод (многократное замораживание, например, в ванне с жидким азотом, и оттаивание, например, в теплой воде) — быстрый, удобный, относительно дешевый — позволяет обрабатывать одновременно большое количество биомассы и дает легко воспроизводимые результаты, однако имеет свои ограничения. Клетки, разрушаемые таким способом, должны обладать не очень прочной стенкой или не содержать ее, а интересующие внутриклеточные компоненты должны быть относительно стабильны к подобного рода обработке, не подвержены денатурации и защищены от протеолиза.

8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА

Содержание белка можно измерять непосредственно в нерассеивающих (истинных) растворах или после проведения гидролиза клеток и отдельных клеточных структур. Для каждого эксперимента выбирают методы, которые удовлетворяют по скорости, точности и удобству измерений. При определении строят калибровочные кривые, анализируя известное количество белка в тех же условиях, что и опытные пробы. Если перед проведением опреде-

ления содержания белка требуется гидролиз материала, необходимо в тех же условиях провести и гидролиз стандарта, используемого для построения калибровочного графика. Во всех случаях необходимо учитывать только те значения графика, которые лежат в области 0,1—0,7 оптической единицы в кювете с длиной оптического пути 1 см, при этом значения поглощения опытных образцов должны находиться в пределах полученных экспериментальных точек калибровочного графика. В необходимых случаях проводят кратные разведения исходного материала. Калибровочные кривые строят с использованием растворов альбуминов — бычьего сывороточного, яичного или из сыворотки человека.

8.2.1. Измерение поглощения при 280 нм

Это наиболее простой и быстрый метод измерения количества белка в содержащих его нерассеивающих растворах. Преимуществами метода является быстрота и неизменность пробы до и после анализа. К недостаткам следует отнести то, что метод не является строго количественным, так как основан на поглощении тирозиновых, фенилаланиновых и триптофановых остатков. Поэтому различные белки имеют разные коэффициенты поглощения, а если белок не содержит вышеуказанных аминокислот, то он не будет поглощать при 280 нм. Метод применим для измерения концентраций белка и в растворах смесей белков.

Для большинства рутинных измерений можно с большой вероятностью допустить, что поглощение при 280 нм раствора белка с концентрацией 1 мг/мл даст значение A_{280} около 1 в кювете с рабочим расстоянием 10 мм. Более скрупулезные исследования показывают, однако, что поглощение одинаковых по концентрации белков может значительно различаться (табл. 12).

Область чувствительности метода лежит в пределах от 0,2 до 2,0 мг белка/мл, а в микрокюветах возможно измерение 0,1 мл пробы (~0,05 мг белка). Для измерения необходим спектрофотометр, позволяющий регистрировать ближнюю ультрафиолетовую область спектра, кварцевые кюветы и пипетки для переноса образцов.

При измерении выставляют значенные спектрофотометра при 280 нм на 0 поглощения в кювете с экспериментальным буферным раствором, затем в той же или аналогичной кювете измеряют погло-

Таблица 12

Различия в поглощении растворов некоторых белков

Белок	A_{280} (1 мг/мл)
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	0,70
Рибонуклеаза А	0,77
Яичный альбумин	0,79
Энтеротоксин	1,33
γ -Глобулин	1,38
Трипсин	1,60
Химотрипсин	2,02
α -Амилаза	2,42

шение раствора белка в таком же буфере. В случае измерения на двухлучевом спектрофотометре устанавливают значение прибора на 0 при 280 нм и измеряют образец против контроля с соответствующим буферным раствором.

Стеклянные и пластиковые кюветы значительно поглощают ультрафиолетовый свет и не пригодны при измерении белка вышеописанным методом. Если поглощение слишком велико, можно использовать кюветы с более короткими рабочими расстояниями, когда разбавление пробы нежелательно.

Оптический метод широко используется для быстрого неразрушающего определения концентрации белков, например при колоночной хроматографии белков. Однако не любое поглощение при 280 нм можно принимать за белковое, так как нуклеиновые кислоты (максимум поглощения при 260 нм) могут вносить значительный вклад в абсорбцию, если присутствуют в пробе. Если измеряемый образец сильно загрязнен нуклеиновыми кислотами, то более точно концентрация белка вычисляется по формуле, учитывающей вклад абсорбции при 260 нм (нуклеиновые кислоты):

$$\text{концентрация белка (мг/мл)} = 1,5 A_{280} - 0,75 A_{260}.$$

Результаты экспериментов показывают, что если отношение $A_{280} - A_{260}$ около 2,0, то содержание нуклеиновых кислот в пробе измеряемых белков незначительно. При высоком содержании нуклеиновых кислот в пробе гораздо более специфичным является определение белка по Брэдфорду.

8.2.2. Определение белка по Брэдфорду

Это быстрый и удобный метод измерения концентрации растворенных белков, основанный на количественном связывании белков с красителем. Он не применим для измерения белка в рассеивающих образцах. Хотя число соединений, мешающих определению белка этим методом сравнительно невелико, краситель реагирует более или менее сильно с различными очищенными белками. Поэтому определение концентрации различных по составу белков этим методом лишь до некоторой степени количественное. К преимуществам метода можно отнести быстроту определения (10 мин) и высокую чувствительность. К недостаткам — варьирование результатов при определении концентраций различных белков и необратимое денатурирование порции белка, пошедшей на определение.

Для определения требуется спектрофотометр или ФЭК (длина волны максимума поглощения 595 нм), кюветы (можно пластиковые), пипетки, пробирки, штатив для пробирок. В качестве стандарта применяют бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл) или яичный альбумин, который дает более точные результаты.

Стандартный исходный раствор содержит 350 мг краски (Serva Blue G или Brilliant Blue R, Sigma), 100 мл 95%-ного

этанола и 200 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Данный раствор стабилен при комнатной температуре. Рабочий раствор состоит из 30 мл стандартного исходного раствора, 15 мл 95%-ного этанола, 30 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты и 425 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор пропускают через фильтр № 1 (Whatman). Он хранится при комнатной температуре в затемненной бутылке в течение нескольких недель с периодическим фильтрованием.

Для определения в пробу белка (100 мкл максимум) добавляют буфер до 100 мкл (если требуется) и 1 мл рабочего раствора краски, перемешивают и после 2 мин инкубации определяют оптическую плотность раствора при 595 нм. Оптическая плотность может измениться через 1 ч с момента добавления раствора краски.

Стандартную кривую строят по растворам яичного альбумина (или бычьего сывороточного) с содержанием белка от 2 до 20 мкг/100 мкл пробы (20—200 мкг/мл). Значения оптической плотности в этом случае должны быть в пределах 0,1—0,7 ед. при 595 нм.

8.2.3. Определение белка по Лоури

Этот метод определения белка был предложен Лоури с соавт. в 1951 г. и с тех пор широко используется в лабораторной практике. К преимуществам метода относятся его универсальность и точность, а к недостаткам — отрицательное влияние многих соединений, что может быть преодолено осаждением белка из раствора перед определением, медленное развитие цветной реакции, нестабильность некоторых реактивов, а также необратимая денатурация порции белка, пошедшей на определение. Чувствительность метода от 5 до 100 мкг белка/мл.

Для определения требуется спектрофотометр или ФЭК (длина волны максимума поглощения 750 нм), кюветы (можно пластиковые), пипетки, пробирки, штатив для пробирок. В качестве стандарта можно применять бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл), однако яичный альбумин дает более правильные результаты. Ниже приведена современная модификация метода. Для определения готовят рабочие растворы А, В, С и D. Раствор А содержит 0,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (цитрат натрия) на 100 мл дистиллированной воды. Раствор В содержит 20 г Na_2CO_3 и 4 г NaOH в 1 л дистиллированной воды, растворы А и В устойчивы при комнатной температуре. Раствор С состоит из 50 мл раствора В и 1 мл раствора А (готовят перед определением). Раствор D представляет собой разведенный в 2 раза дистиллированной водой перед определением реактив Фолина (приготовление реактива Фолина см. в Приложении, с. 212).

Процедура определения состоит в смешивании 0,5 мл пробы белка и 2,5 мл раствора С. После перемешивания и инкубации

при комнатной температуре 5—10 мин добавляют 0,25 мл раствора D, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре 20—30 мин и измеряют оптическую плотность раствора при 750 нм.

Проба белка может быть отделена от мешающих определению веществ осаждением трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Этим же способом можно пользоваться при определении белка в сильно разбавленных растворах (менее 1 мкг/мл). Для осаждения к пробе белка в 1 мл добавляют 0,1 мл 0,15%-ного раствора дезоксихолата натрия (ДХН), перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 мин. К смеси добавляют 0,1 мл 72%-ной ТХУ, перемешивают и выпавший осадок отделяют центрифугированием при 1—3 тыс. g в течение 5—30 мин. При использовании угловых роторов, низких температурах или больших объемах время осаждения увеличивают. После осаждения надосадочную жидкость сливают и отбрасывают, осадок перерастворяют в реактиве С.

Метод применим и для определения белка в гидролизатах клеток микроорганизмов. Для гидролиза применяют 2 М КОН и ведут его при 37° в течение 2 ч, ночь при комнатной температуре или 10 мин на кипящей водяной бане.

Время развития цветной реакции обычно не превышает 20—30 мин, после добавления реактива D, затем оптическая плотность уменьшается примерно на 1% в час. Большинство мешающих определению веществ снижает развитие окраски, однако некоторые детергенты могут наоборот ее усилить.

8.3. АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Анализ нуклеиновых кислот получил широкое распространение при идентификации и систематике прокариот, поскольку вся или основная генетическая информация заключена в 1 молекуле ДНК. Это делает возможным ее изучение без опасения загрязнения другими ДНК (митохондриальной, хлоропластной), как может быть в случае эукариотных организмов.

Геномы различных бактерий сравнивают по их размерам, общему содержанию оснований ДНК (молярная доля гуанина и цитозина в ДНК, %) по последовательностям нуклеотидов рибосомных РНК и степени гибридизации нуклеиновых кислот. Для разных прокариот установлены границы молярного содержания ГЦ в ДНК от 23 до 75%. Значение ГЦ постоянно для данного микроорганизма. Если по этой характеристике штаммы значительно отличаются (более чем на 10%), то это свидетельствует, что они относятся к разным родам. Однако близкие значения ГЦ в ДНК не обязательно говорят о филогенетическом родстве, поскольку организмы могут значительно отличаться по последовательностям нуклеотидов в ДНК. Поэтому более важным является сравнение гомологии участков ДНК или РНК изучаемых видов. Достаточно простыми и доступными являются методы гибридизации ДНК—ДНК или ДНК—рРНК сравниваемых объектов, которые используют после их выделения и очистки.

8.3.1. Выделение и очистка ДНК

Для выделения нуклеиновых кислот из клеток обычно применяют мягкие методы их разрушения, включающие использование детергентов и лизоцима, хотя для разрушения некоторых микроорганизмов с прочными клеточными стенками может понадобиться пресс, стеклянные бусы или растирание клеток с абразивами (см. раздел 8.1.2). В некоторых случаях для «ослабления» клеточных стенок в растущие культуры (например, грамположительных бактерий) добавляют глицин, лизин или треонин. Иногда для тех же целей клетки грамположительных бактерий в растущих культурах обрабатывают антибиотиками, такими как пенициллин С или метициллин, которые подавляют биосинтез пептидогликана клеточной стенки. Чувствительность к лизоциму микобактерий, содержащих высокий процент липидов и полисахаридов в клеточной стенке, может быть усилена их обработкой изопропанолом. При лизисе микроорганизмов, имеющих особенно прочные клеточные стенки, применяют поли(этиленгликоль) с последующим удалением излизата, так как его присутствие мешает проведению дальнейшей очистки ДНК.

Очистку ДНК из разрушенных клеток ведут последовательным отделением от белков обычно с использованием смесей хлороформ-изоамиловый спирт или фенол-хлороформ и многократным переосаждением ДНК этанолом. От следов РНК препараты ДНК освобождают с помощью РНКазы, а от следов белка — с помощью протеаз. ДНК сушат под вакуумом и хранят при 4°.

8.3.2. Определение нуклеотидного состава ДНК

Для определения молярного содержания ГЦ (%) в ДНК чаще всего применяют два метода: основанный на измерении плавучей плотности или анализе кривых температуры плавления (T_m) выделенных ДНК. В качестве стандарта в обоих случаях применяют ДНК известного состава, выделенную тем же методом. Оба метода быстрые и дешевые, хотя более точным является метод фракционирования ДНК на основания и количественное определение каждого нуклеотида в отдельности с использованием хроматографии на бумаге. Однако этот метод более длителен, трудоемок и для получения воспроизводимых результатов необходима тщательная очистка препарата ДНК от РНК.

Различия в спектрах поглощения очищенных ДНК также могут быть использованы при определении их состава в сравнении с препаратом ДНК известного процентного содержания ГЦ. Этот метод дает быстрое и точное определение. Он считается удобной альтернативой, если оборудование для определения плавучей плотности или термальной денатурации ДНК недоступно.

Метод тепловой денатурации основан на разрушении водородных связей между комплементарными цепями нативной ДНК и их расхождении друг от друга при повышении температуры раство-

ра ДНК. Однонитевые ДНК имеют поглощение при 260 нм примерно на 40% больше, чем двунитевые. При нагревании раствора ДНК процент однонитевых ДНК увеличивается и наблюдается увеличение поглощения при 260 нм (гиперхромизм). Термостабильность водородных связей между гуанином и цитозином в ДНК выше по сравнению со связями между аденином и тимином. Поэтому, чем выше содержание Г+Ц пар в молекуле ДНК, тем больше энергии требуется для расхождения нитей. После расхождения цепей ДНК поглощение при 260 нм раствора с повышением температуры не увеличивается. Значение температуры плавления (T_m) соответствует температуре, при которой в растворе содержится 50% разошедшихся нитей ДНК (температура 50%-ного гиперхромизма). Эти значения линейно соответствуют молярному содержанию ГЦ в ДНК между 30 и 70%.

Широко используют следующую модификацию этого метода. Раствор ДНК доводят до плотности приблизительно 25 мкг/мл ($A_{260}=0,50$) в 1-сантиметровых кварцевых кюветах с герметичными крышками и термопарой (фиксирующей температуру), конец которой должен быть непосредственно под поверхностью раствора. Кюветы помещают в регистрирующий спектрофотометр с термостатирующим устройством. Температуру устанавливают равной 25° и регистрируют поглощение в опытной кювете при 260 нм против контрольной с растворителем. Температуру медленно повышают (0,5°/мин) и проводят постоянную регистрацию изменения поглощения. Значение температуры, дающее 50%-ное увеличение поглощения, будет соответствовать значению T_m для данной ДНК.

Поскольку значения молярного содержания ГЦ (%) и T_m связаны линейно, то расчет для неизвестной ДНК производится сравнительно просто. На расчеты влияют концентрации буферных растворов, в которых проводят измерения, так как значение T_m логарифмически зависит от концентрации иона натрия в растворе. Наиболее широко применяемым при измерении значений тепловой денатурации буфером является цитратно-солевой (1·SSC, 0,015 М тризамещенного цитрата натрия в 0,15 М NaCl, pH 7,0). Для этого буферного раствора установлено следующее соотношение:

$$\text{молярное содержание ГЦ, \%} = 2,44 T_m - 169,00.$$

В случае ДНК с высокими молярными ГЦ, % используют более разбавленные буферные растворы, например 0,33 или 0,1-кратный раствор SSC. Для таких растворов уравнения выглядят следующим образом:

$$0,33 \cdot \text{SSC} : \text{молярное содержание ГЦ, \%} = 2,47 T_m - 135,14;$$

$$0,1 \cdot \text{SSC} : \text{молярное содержание ГЦ, \%} = 2,08 T_m - 106,40.$$

С целью воспроизводимости результатов, проверки метода и аппаратуры необходимо регулярно определять данным методом содержание ГЦ в ДНК из *E. coli* ATCC 11775, поскольку этот штамм является международным стандартом и T_m его ДНК в 1·SSC равна 90,5°, а значение плавучей плотности — 1,710.

Метод определения состава ДНК по плавучей плотности основан на том, что если раствор ДНК подвергнуть высокоскоростному центрифугированию в градиенте плотности CsCl, то через определенное время она займет в градиенте место, соответствующее своей плавучей плотности. Значение плотности ДНК в середине пика, формируемого в центрифужной пробирке, называется плавучей плотностью ДНК. Она линейно зависит от молярного содержания ГЦ, %. Метод был впервые описан в 1962 г. и с тех пор не претерпел значительных модификаций.

Измерение плавучей плотности ДНК производят следующим образом. Сухой CsCl растворяют в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 7,3) до плотности 1,7 г/см³ и вносят 2—3 мкг исследуемой и реперной (с известным составом) ДНК. Растворы переносят в чистые и сухие центрифужные пробирки, помещают в аналитическую центрифугу и центрифугируют при 150 тыс. *g* в течение 20 ч при 25°. За это время градиент обычно формируется полностью.

Плавучая плотность неизвестной ДНК рассчитывается с использованием расстояния между серединой ее пика и серединой пика реперной ДНК на градиенте плотности CsCl. Маркерная ДНК должна быть выбрана заранее, чтобы ее пик не перекрывал пик определяемой ДНК. Нуклеотидный состав ДНК и ее плотность (ρ) связана следующей зависимостью:

$$\rho = 1,660 + 0,098 (Г + Ц).$$

3.3.3. Гибридизация нуклеиновых кислот

Методы гибридизации ДНК/ДНК и ДНК/рРНК получили в последние годы широкое распространение при идентификации новых штаммов бактерий. Они позволяют установить степень генетического родства изучаемого штамма с определенным родом, видом или выявить штаммовые различия. Принцип метода заключается в денатурации выделенной двухцепочечной ДНК нагреванием и фиксации разошедшихся цепей на фильтрах. При понижении температуры возможна ренатурация цепей, причем соединиться с цепью может только комплементарная ей последовательность оснований, а температура связывания во многом определяет результаты опыта. Количество ренатурированной двуспиральной ДНК служит прямой мерой сходства геномов сравниваемых организмов, причем последовательности, образующие двухцепочечные комплексы, не обязательно комплементарны по всем нуклеотидам.

При гибридизации фрагменты одноцепочечной ДНК известного микроорганизма (ДНК-репер) закрепляют на фильтре и добавляют радиоактивно меченные фрагменты одноцепочечной ДНК изучаемого штамма. Контролем служит связывание гомологичной реперу ДНК (100%-ная гибридизация). Меченая ДНК (зонд) должна составлять в опыте не более 1:300—1:500 части от прикрепленной к фильтру немеченой ДНК-репера. Связывание зонда в пределах 100—70% считают штаммовыми различиями, 70—

50% — различиями видовыми, менее 50% — различиями на уровне рода. Данный метод удобен и объективен, однако может применяться лишь для определения сходства бактерий на уровне рода и более низком таксономическом уровне.

Для проведения гибридизации клетки изучаемого штамма разрушают тем или иным способом (см. 8.1), выделяют ДНК, фрагментируют ее ультразвуком на кусочки длиной 300—350 пар оснований (определяется электрофорезом в 1%-ной агарозе), денатурируют нагреванием и закрепляют на нитроцеллюлозных фильтрах. ДНК сравниваемого штамма готовят таким же способом, вводят реактивную метку ник-трансляцией с помощью меченого нуклеозид-5'-трифосфата при одновременном действии ДНКазы I и ДНК полимеразы 1 *E. coli* и используют для гибридизации. Ее чаще всего проводят по методу Денхардта в 20%-ном формамиде при 62° в течение 18—24 ч («мягкая ренатурация»), отмывают от несвязавшейся меченой ДНК, и радиоактивность фильтров просчитывают в сцинтилляционном счетчике. Гибридизацию гомологичных ДНК принимают за 100% и рассчитывают проценты связанной исследуемой ДНК с ДНК реперного штамма. Процент связанной ДНК отражает степень гомологии молекул и служит показателем родства штаммов. Аналогичная реассоциация может быть осуществлена между молекулами ДНК и рРНК, поскольку двойные спирали образуются также между одноцепочечными ДНК и комплементарными цепями РНК. Подробнее методы описаны в справочном руководстве (Герхард и др., 1984).

8.3.4. Каталогизация нуклеотидных последовательностей 5S и 16S рРНК

Гибридизации ДНК—ДНК и ДНК—рРНК требуют прямого экспериментального сравнения изучаемых микроорганизмов. В отличие от этого методы анализа генома, построенные на определении последовательностей нуклеотидов в высококонсервативных полимерных молекулах клетки, таких как 5S, 16S (18S) или 23S (28S) рРНК, дают возможность оценивать данные, полученные в разное время и в разных лабораториях. С помощью сравнения последовательностей нуклеотидов можно проводить филогенетический анализ любых организмов, как про- так и эукариотных, и строить эволюционные деревья, что важно для определения степени их родства и путей эволюции жизни.

Метод изучения последовательностей нуклеотидов 5S рРНК по сравнению с анализом 16S рРНК (или аналогичной 18S рРНК у эукариот) дает меньше информации. Это понятно, исходя из длины цели молекул (120 и 1500—1600 нуклеотидов соответственно). Анализ нуклеотидных последовательностей 5S рРНК, тем не менее, проводят во многих лабораториях, так как он более прост, быстр и дешев, по сравнению с анализом 16S рРНК. Последовательности нуклеотидов сравнивают между собой для получения коэффициента сходства (S_{AB}), характеризующего подобие нуклео-

тидов у организмов А и В. Коэффициент S_{BA} рассчитывают путем деления суммы нуклеотидных остатков, находящихся в общих для двух организмов нуклеотидах, на сумму нуклеотидных остатков, содержащихся во всех сравниваемых нуклеотидах, определенных у организмов А и В. Коэффициенты S_{AB} используют для построения дендрограмм, которые рассматривают как филогенетические деревья. Подробнее методы описаны в справочном руководстве (Герхард и др., 1984).

84. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИ- β ОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (ПБОМК)

Многие бактерии образуют ПБОМК (и другие полимеры на основе окси-жирных кислот и их производных) в качестве внутриклеточного запасного продукта. Иногда способность к такому синтезу служит диагностическим признаком.

Для экстракции ПБОМК из клеток биомассу после осаждения высушивают смесью диэтилового эфира и метанола (1:1, объем/объем). Сухую биомассу освобождают от остатков растворителей в вытяжном шкафу. Осадок растирают в ступке до порошкообразного состояния и взвешивают. Если для анализа берут сухую биомассу, то этап высушивания смесью растворителей пропускают.

ПБОМК экстрагируют из навески биомассы смесью хлороформа и метанола (2:1, объем/объем) при 60° в водяной термостатированной бане в колбе или пробирке с притертой и прижатой пробкой (во избежание ее выталкивания при испарении растворителей и подъема давления внутри колбы или пробирки). Для экстракции берут 5 мл смеси растворителей на 0,5 г сухих клеток. Экстракцию ведут в течение 20 мин при периодическом покачивании содержимого, затем экстракт сливают с осадка и экстракцию повторяют. После экстракции осадок биомассы отбрасывают.

Объединенные экстракты фильтруют через стеклянный фильтр и упаривают досуха под вакуумом или в вытяжном шкафу в фарфоровой чашке на кипящей водяной бане. Осадок после упаривания растворяют в 1 н. серной кислоте (5 мл на каждый грамм высушенной исходной биомассы) и ПБОМК гидролизуют в течение 2 ч на кипящей водяной бане или в термостате при 100—105°. Гидролизат фильтруют через стеклянный фильтр под вакуумом, доводят его объем до 5 мл 1 н. серной кислотой и измеряют экстинкцию при 235 нм против серной кислоты на спектрофотометре. Калибровочную кривую строят на 3-гидроксимасляной кислоте с кислотной обработкой ее параллельно опытной пробе.

85. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахариды, образуемые микроорганизмами, входят в состав ряда компонентов клеток, в частности в клеточную стенку, служат запасными веществами, локализуются внутри и вне клетки. Внеклеточные полисахариды могут быть капсульными или

свободными. Часто полисахариды определяют антигенную специфичность штамма, выполняют защитную функцию, играя роль барьера проницаемости для молекул, ионов или препятствуют потере клеткой влаги.

Из культуральной жидкости полисахариды выделяют осаждением 3—5 объемами этанола или изопропанола, осадок, образующийся за 24 ч при комнатной температуре отделяют центрифугированием (3 тыс. g, 15 мин) и сушат на воздухе.

Для определения моносахаридного состава проводят гидролиз 1—2%-ного препарата полисахарида в 1 н. HCl при 100° в течение 3 ч в герметическом сосуде и смесь затем доводят сухим бикарбонатом натрия до нейтральной реакции по индикатору. Раствор гидролизованного полисахарида хранят в холодильнике.

Количество редуцирующих сахаров в гидролизате полисахарида определяют по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ), используя в качестве стандарта раствор D-глюкозы. Качественный моносахаридный состав полисахарида определяют методом хроматографии на бумаге с соответствующими свидетелями.

Для определения образования внутриклеточных полисахаридов в качестве запасных веществ проводят кислотный гидролиз клеточной массы и в гидролизате определяют количество редуцирующих сахаров.

8 6 ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Главный полимер клеточной стенки большинства бактерий — пептидогликан (ПГ). В современной классификации грамположительных бактерий для характеристики рода и вида учитывают его строение. Известно около 100 типов ПГ. Все грамотрицательные бактерии содержат за небольшими исключениями один тип ПГ. У этих бактерий его строение не является таксономическим признаком.

8.6.1. Выделение и очистка фракций клеточных стенок

Клеточные стенки бактерий для анализа ПГ получают после их механического разрушения (ультразвуковой дезинтегратор с бусами или без; декомпрессионный шок, см. выше) и центрифугирования при 15 тыс. g в течение 20 мин (условия осаждения могут несколько отличаться в зависимости от вида). При этом осадок делится на два слоя: нижний — неразрушенные клетки, и верхний — клеточные стенки студенистой консистенции. Верхний слой осадка отделяют и несколько раз промывают водой, пока расслаивание осадка не прекратится (нижний слой каждый раз отбрасывают). После последнего промывания (обычно 5—6 раз) верхний слой отмытых клеточных стенок лиофилизируют или

высушивают при обработке спиртом (3 раза), эфиром (2 раза), затем на воздухе или в вакуум-эксикаторе.

Высушенную массу стенок грамположительных бактерий экстрагируют трихлоруксусной кислотой (ТХУ) для удаления тейхоевых кислот. С этой целью к 100—200 мг сухих клеточных стенок добавляют 10—20 мл 5%-ной ТХУ и суспензию нагревают при 100° 20 мин. Смесь охлаждают и осадок стенок отмывают водой при центрифугировании до кислотности близкой к нейтральной. Осадок суспендируют в 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,8), препарат обрабатывают трипсином (2,5 мг сухого фермента в 2,5 мл буфера на каждые 10 мг стенок) в течение 20 мин при 37° при постоянном перемешивании. Осадки стенок промывают 3 раза буфером и обрабатывают 2%-ным дезоксихоломатом натрия в том же буфере для удаления белков. Обработку ведут 5 мин при 100°. Дeterгент затем отмывают 3 раза 1 н. NaCl и затем 3—5 раз дистиллированной водой. Полученный препарат ПГ высушивают при обработке спиртом (3 раза), эфиром (2 раза) и досушивают в вакуум-эксикаторе.

8.6.2. Анализ состава пептидогликана

Выделенный и очищенный препарат ПГ гидролизуют в 4 н. HCl. Для этого 2—3 мг ПГ помещают в ампулу, добавляют 0,5 мл кислоты и запаянную ампулу инкубируют в течение 16 ч при 100°. В редких случаях бывает необходимым гидролиз препарата 6 н. HCl 18 ч при 120° или 3 н. трифторуксусной кислоте 4 ч при 100°. После проведения гидролиза и охлаждения ампулы ее вскрывают и гидролизат переносят на чашечку из фторопласта. HCl из гидролизата удаляют в вакуум-эксикаторе, многократно добавляя в чашечку по 0,5 мл дистиллированной воды и высушивая в эксикаторе. В дальнейшем гидролизат количественно переносят в мерную пробирку, объем доводят бидистиллированной водой до 1 мл и при необходимости центрифугируют. Анализ гидролизата проводят на аминокислотном анализаторе, после чего вычисляют мольное отношение аминокислот, мурамовой кислоты и глюкозамина. В том случае, когда в гидролизате обнаружена диаминопимелиновая кислота, определяют ее стереоизомер.

Для определения стереоизомера диаминопимелиновой кислоты (ДАП) гидролизат ПГ (из расчета 1 мг исходного ПГ; при отсутствии белка в клеточной стенке можно использовать ее гидролизат) разделяют хроматографией на бумаге в системе растворителей: метанол—вода—НСl—пиридин (40:13:2·5, объем/объем). Хроматограмму высушивают, опрыскивают 0,5%-ным нингидрином и нагревают в течение 5 мин при 100—110°. ДАП проявляется в виде желтых пятен на белом фоне. Полученные пятна сравнивают по R_f со стандартными образцами мезо- и L-формами ДАП, которые должны быть нанесены на ту же хроматограмму в качестве свидетелей.

В некоторых случаях для таксономических целей необходимо определить только природу диаминокислоты. ДАП определяют вышеописанным способом, лизин — хроматографически в системе бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1) и сравнивают со стандартом.

Идентификацию редких диаминокислот проводят несколькими способами — хроматографически в разных системах растворителей или на аминокислотном анализаторе с соответствующими свидетелями.

В гидролизате определяют аминсахарный и аминокислотный состав ПГ. В большинстве случаев для целей таксономии достаточно определить мольное отношение аминсахаров и аминокислот. В ПГ может быть от 3 до 6 различных аминокислот, однако в их составе никогда не встречаются разветвленные и ароматические аминокислоты.

Предположим, что в пробе гидролизата ПГ получено следующее количество аминсахаров и аминокислот (в мкмолях): мурамовая кислота (М) — 4,03; глюкозамин (ГН) — 4,52; диаминопимелиновая кислота (ДАП) — 5,03; аланин (А) — 9,81; глутаминовая кислота (ГК) — 5,40 (М—ГН—ДАП—А—ГК — 0,80:90:1,00:1,95:1,02). Учитывая, что мурамовая кислота и глюкозамин при кислотном гидролизе частично подвергаются разрушению, истинное мольное отношение в природном полимере данного типа составляет, по-видимому, 1:1:1:2:1.

Выяснив, что ДАП имеет мезо-форму, приходим к выводу, что ПГ имеет A_1T тип, т. е. все остатки мурамовой кислоты замещены тетрапептидом, состоящим из двух остатков аланина, ДАП, глутаминовой кислоты, и перекрест между соседними пептидными единицами осуществляется напрямую (без аминокислот в мостике) между ДАП одной цепи и последним аланином другой.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Для решения многих задач бывает достаточным определение некоторых, легко выявляемых свойств культур микроорганизмов, а также их физиолого-биохимических особенностей. Знание таковых, в сочетании с характеристикой морфологии микроорганизма, иногда позволяет установить его принадлежность к тому или иному таксону — классу, порядку, семейству.

9.1. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

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

9.1.1. Рост 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 растет микроорганизм клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием и являются наиболее существенной особенностью роста многих микроорганизмов на плотном субстрате. При их описании учитывают следующие признаки:

форму колонии — округлая, амебовидная, неправильная, ризоидная и т. д. (рис. 57);

размер (диаметр) колонии измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

поверхность колонии — гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

профиль колонии — плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д. (рис. 58);

блеск и прозрачность — колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

цвет колонии — бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная — белая, желтая, золо-

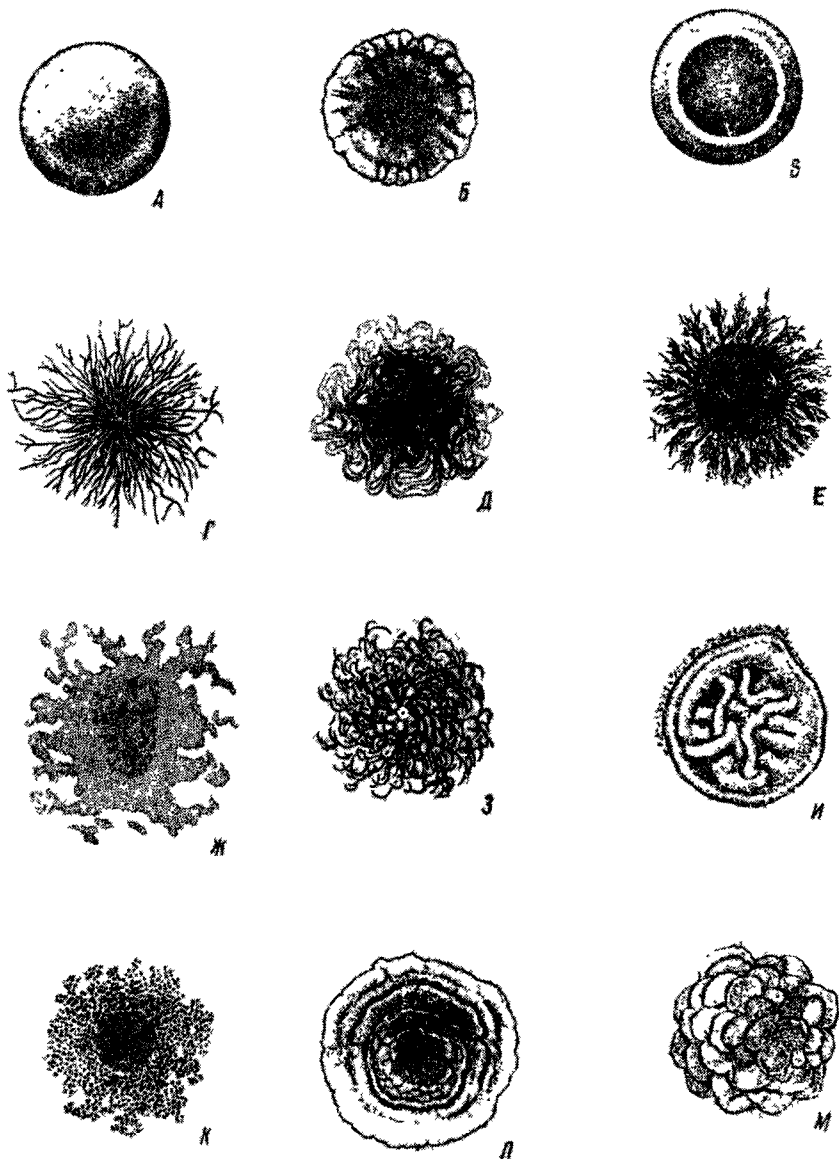


Рис. 57 Форма колоний:

А — круглая, Б — круглая с фестончатым краем, В — круглая с валиком по краю; Г, Д — ризоидные; Е — с ризоидным краем; Ж — амёбовидная; З — нитевидная; И — складчатая; К — неправильная, Л — концентрическая, М — сложная

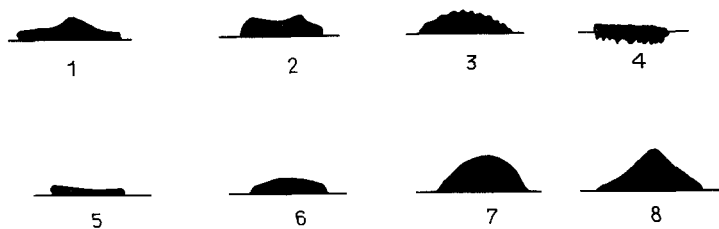


Рис. 58. Профиль колонии:
 1 — изогнутый; 2 — кратерообразный; 3 — бугристый; 4 — врастающий в субстрат; 5 — плоский; 6 — выпуклый; 7 — каплевидный; 8 — конусовидный

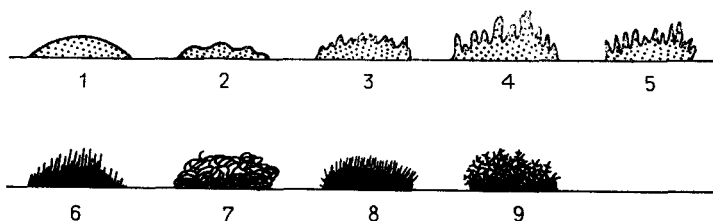


Рис. 59. Край колонии:
 1 — гладкий; 2 — волнистый; 3 — зубчатый; 4 — лопастной; 5 — неправильный; 6 — реснитчатый; 7 — нитчатый; 8 — ворсинчатый; 9 — ветвистый

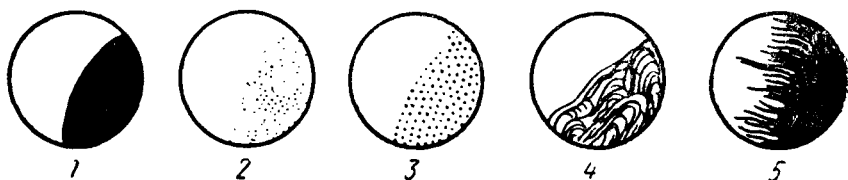


Рис. 60. Структура колонии:
 1 — однородная; 2 — мелкозернистая; 3 — крупнозернистая; 4 — струйчатая; 5 — волокнистая

тистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная. Особо отмечают выделение пигмента в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, а также выделение пигментов в среду;

край колонии — ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д. (рис. 59);

структуру колонии — однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т. д. (рис. 60). Край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз;

консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, пленчатой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии, напротив, 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 углекислоту или другие газы.

Донные колонии разных микроорганизмов имеют обычно 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: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

Для описания колоний и роста по штриху многие микроорганизмы часто выращивают на мясо-пептонном агаре. Применяют также мясо-пептонную желатину. Для лучшего рассмотрения глубинных колоний среды с агаром или желатиной рекомендуется осветлять.

9.1.2. Рост в жидких питательных средах

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен. Он 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 он или обильный, плотный рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью «поплавков» — маленьких запаянных с одного конца трубочек. Поплавки помещают в пробирку запаянным концом вверх перед стерилизацией среды и следят, чтобы он полностью был заполнен средой. В случае выделения газа он скапливается в поплавке в виде пузырька.

Для описания характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на МПБ или другой среде, обеспечивающей хороший рост.

92 ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание их способности расти на разных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в состав этих сред. Учитывают использование различных соединений углерода, азота и серы, отношение к молекулярному кислороду, способность образовывать антибиотические вещества и проявлять ферментативную активность в отношении определенных субстратов. Проверяют чувствительность микроорганизмов к разным антибиотикам.

9.2.1. Использование соединений углерода

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма. Чтобы выяснить возможность роста микроорганизмов за счет тех или иных углеродсодержащих веществ, их высевают обычно на синтетические среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. Из углеводов и многоатомных спиртов испытывают, как правило, следующие соединения: арабинозу, ксилозу, рамнозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, сорбозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, целлобиозу, рафинозу, декстрин, крахмал, инулин, целлюлозу, глицерол, эритрит, маннит, дульцит, сорбит, инозит, салицин.

Для определения способности микроорганизмов использовать углеводы и спирты поступают следующим образом. Готовят основной фон среды, который часто имеет следующий состав (г/л): пептон — 5,0, K_2HPO_4 — 1,0. В зависимости от физиологических особенностей микроорганизмов можно применять иной состав фона. Так, например, для коринеподобных бактерий рекомендуется такая фоновая среда (г/л): пептон — 3,0; $NaCl$ — 2,5, а для актиномицетов — среда состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ — 2,6; KH_2PO_4 — 2,4; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 5,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0; раствор микроэлементов¹ — 0,1 мл; вода дистиллированная.

Рост микроорганизмов на средах с углеводами или многоатомными спиртами часто сопровождается накоплением органических кислот, нейтральных продуктов, газов. Образование кислот регистрируют по изменению pH среды. Для этого к основному фону добавляют индикатор из расчета 2 мл 1,6%-ного спиртового ра-

¹ Раствор микроэлементов (г): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,64; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,11; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 0,79; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,15, вода дистиллированная — 100. Раствор готовят отдельно и хранят при температуре 3—5°.

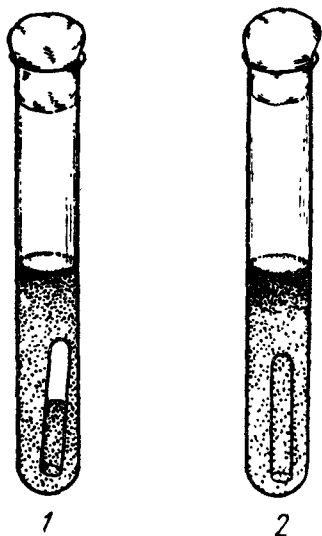


Рис. 61. Накопление газа в полавке:
1 — рост культуры сопровождается образованием газа; 2 — газ не образуется

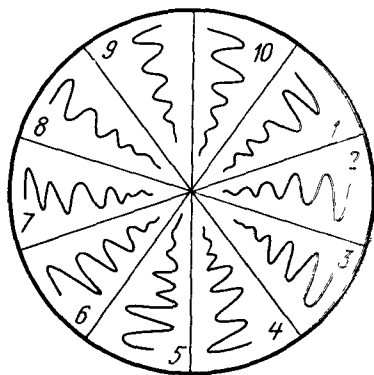


Рис. 62. Схема посева на плотную среду различных микроорганизмов (1, 2, 3, ...10) для определения способности использовать углеводы

створа на 1 л среды. В качестве индикатора применяют бромтимолблау, который изменяет окраску от желтой к синей в интервале рН 6,0—7,6, или бромкрезолпурпур, изменяющий цвет от пурпурного к желтому в интервале рН 6,8—5,2. «Основной фон» разливают в пробирки по 8—10 мл, опускают на дно каждой пробки поплавок и стерилизуют при 1,0 ати.

Углеводы и спирты готовят в виде 10%-ных водных растворов и стерилизуют отдельно от основного фона среды автоклавированием при 0,5 ати или фильтрованием. Раздельная стерилизация рекомендуется в связи с тем, что сахара в присутствии фосфатов и других компонентов среды частично разрушаются и образуют соединения, токсичные для микроорганизмов. Стерильные растворы добавляют к основному фону в таком количестве, чтобы концентрация сахара (спирта) в среде составляла 1 г на 100 мл. Среды засевают суспензией клеток микроорганизмов и выдерживают в течение 1—5 суток при соответствующей температуре. Медленно развивающиеся микроорганизмы инкубируют в течение 7—10 суток. Рост или его отсутствие на среде с данным источником углерода определяют по помутнению среды, образованию пленки или осадка. Изменение цвета индикатора указывает на образование кислых или щелочных (вследствие разложения пептона) продуктов метаболизма. Об образовании газа свидетельствует накопление его в полавке (рис. 61). Результаты наблюде-

ний сравнивают с показателями роста в контрольной (фоновой) среде, не содержащей испытуемого источника углерода.

Способность микроорганизмов использовать углеводы и многоатомные спирты можно определять и на плотных средах. В этом случае стерильный раствор углевода или спирта добавляют в стерильную агаризованную расплавленную среду, тщательно перемешивают ее и разливают в стерильные чашки Петри. После того как агар застынет, дно чашки Петри с наружной стороны делят на секторы чернилами или карандашом по стеклу. Затем каждую из исследуемых культур микроорганизмов высевают петлей, проводя радиальный штрих (рис. 62). В качестве посевного материала используют густые суспензии клеток, которые готовят смывом культур с поверхности скошенного агара. Продолжительность культивирования 2—10 суток. О результатах судят по интенсивности роста культур в сравнении с ростом на контрольной среде, не содержащей испытываемых соединений углерода. Этот метод удобен тем, что позволяет в одной чашке Петри одновременно проверить способность нескольких микроорганизмов использовать тот или иной субстрат.

Многие микроорганизмы могут использовать в качестве единственного источника углерода органические кислоты. Для определения способности расти на средах с органическими кислотами рекомендуется плотная среда состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; NaCl — 0,1; агар — 15,0; органическая кислота в виде соли Na или K — 2,0; pH 6,8. До стерилизации к среде добавляют 20 мл 0,04%-ного водного раствора индикатора фенолрот, который в интервале pH 6,8—8,4 изменяет окраску от желтой к красной. Среду разливают в пробирки и стерилизуют при 1 ати. Посев проводят уколом, продолжительность культивирования от 2 до 14 суток в зависимости от скорости роста микроорганизмов. О потреблении органических кислот свидетельствует рост по уколу и изменение кислотности среды в щелочную сторону, что отчетливо заметно по цвету индикатора.

Некоторые микроорганизмы способны использовать и такие химически устойчивые соединения, как углеводороды. Выявить способность микроорганизма окислять жидкие нелетучие углеводороды можно на плотной среде состава (г/л): KNO_3 — 4,0; KH_2PO_4 — 0,6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,8; выщелоченный агар — 2,0; pH 7,2. Среду стерилизуют в колбах при 1 ати и разливают в чашки Петри толстым слоем. После того как среда застынет, в центре агаровой пластинки вырезают лунку. Для этой цели можно воспользоваться пробочным сверлом (диаметр 8—10 мм), которое предварительно стерилизуют в пламени горелки. Микроорганизмы высевают радиальными штрихами от лунки к периферии чашки (рис. 63). В лунку вносят 2—3 капли исследуемого углеводорода¹. На чашке с одним углеводородом можно проверить рост нескольких микроорганизмов. Чашки поме-

¹ Стерилизуют фильтрованием.

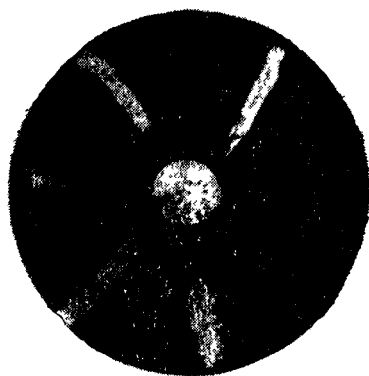
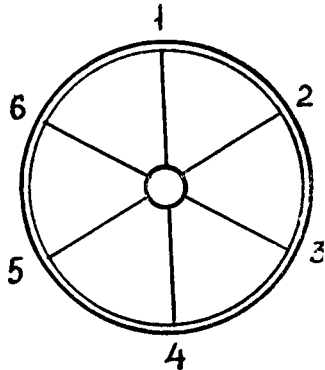


Рис 63. Определение способности микроорганизмов использовать углеводороды:

a — схема посева; 1—6 — штрихи различных микроорганизмов; в центре — лунка с жидким углеводородом; *b* — рост различных культур

щают в термостат строго горизонтально, не переворачивая. Через 7—10 суток отмечают наличие или отсутствие роста по штриху в сравнении с контролем — ростом на среде без углеводорода.

9.2.2. Использование соединений азота

Для определения способности микроорганизмов использовать те или иные соединения азота их выращивают на соответственных питательных средах.

Использование органических азотсодержащих веществ. Многие микроорганизмы могут усваивать азот органических соединений, например, пептонов, аминокислот и белков. В процессе ферментативного гидролиза белка освобождаются аминокислоты, которые используются клеткой непосредственно в процессах биосинтеза, а также подвергаются расщеплению в результате дыхания или брожения до более простых соединений. Поэтому разложение белка микроорганизмами (аммонификация) всегда сопровождается образованием побочных продуктов: аммиака, который выделяется при дезаминировании аминокислот, сероводорода, освобождающегося при разрушении серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина, метионина), а также индола, который образуется при распаде триптофана. Обнаружение этих продуктов в культурах свидетельствует об использовании аминокислот микроорганизмами. Процесс аммонификации всегда сопровождается повышением щелочности среды.

Обнаружение аммиака. Способность микроорганизмов образовывать аммиак можно выявить при их росте в мясо-пептонном бульоне. Для этого МПБ разливают в пробирки по 8—10 мл в каждую и стерилизуют при 1 ати. После посева под ватной

пробкой укрепляют узкую стерильную полоску лакмусовой бумаги¹ так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой (рис. 64). Пробку рекомендуется заворачивать в полиэтилен, чтобы затруднить улетучивание аммиака. При образовании аммиака красный лакмус синееет.

Если используют пептонную воду, то образование аммиака выявляют с помощью реактива Несслера. На фарфоровую пластинку помещают несколько капель культуральной жидкости и добавляют к ним каплю реактива Несслера. В присутствии следов аммиака жидкость окрашивается в желтый цвет, при большом количестве аммиака образуется коричневый осадок.

Обнаружение сероводорода. Выявление способности бактерий продуцировать H_2S основано на реакции образования сульфидов металлов. Наиболее распространенный способ — проба с уксуснокислым свинцом.

Микроорганизмы выращивают в МПБ, содержащем 0,01% цистина и цистеина, которые добавляют к стерильному бульону в виде раствора в подкисленной дистиллированной воде. Растворы цистеина и цистина стерилизуют фильтрованием. После посева исследуемых бактерий над средой помещают стерильную полоску фильтровальной бумаги, пропитанную насыщенным раствором уксуснокислого свинца², укрепив ее под ватной пробкой. Пробку пробирки заворачивают полиэтиленом, чтобы затруднить улетучивание H_2S . Продолжительность культивирования 7—10 суток. Выделение сероводорода обнаруживают по почернению бумаги вследствие образования сульфида свинца.

Более четкие результаты наблюдаются при использовании среды следующего состава (г/л): пептон — 10,0; NaCl — 5,0; цитрат NH_4Fe — 0,30; агар — 15,0; дрожжевой автолизат — 2,0 мл; вода водопроводная, pH среды 7,0. Среду разливают в пробирки, стерилизуют при 0,5 ати, после стерилизации скашивают и делают посев штрихом. О выделении H_2S судят по почернению среды вследствие образования сульфида железа — FeS (рис. 64).

Обнаружение индола. Индол обнаруживают по качественной реакции с реактивом Эрлиха (приготовление реактива см. Приложение). Для выявления индола можно использовать различные среды: МПБ с 0,01% триптофана; 1%-ную казеиновую воду (г/100 мл: казеин — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,2; NaCl — 0,3) или

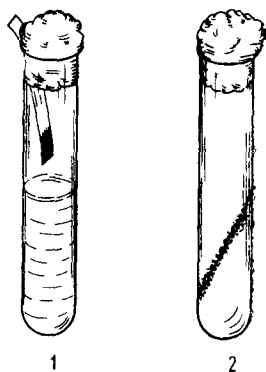


Рис. 64 Обнаружение сероводорода, образующегося микроорганизмами:

1 — почернение свиновой бумаги; 2 — образование в толще среды

¹ Полоски лакмусовой бумаги помещают в чашки Петри и стерилизуют в автоклаве при 0,5 ати.

² Полоски индикаторной бумаги стерилизуют при 0,5 ати, поместив в чашку Петри или в пробирку.

2—3%-ную пептонную воду (г/100 мл: пептон — 2,5; Na_2HPO_4 — 0,2; NaCl — 0,3); pH сред 7,2—7,4. Среды разливают в пробирки по 8—10 мл, стерилизуют при 1,0 ати¹ и засевают суспензией бактерий. Через 5—7 суток проводят качественную реакцию на присутствие индола в культуре и в контроле — стерильной среде. Для этого на поверхность среды, не перемешивая, помещают, 1—2 мл реактива Эрлиха; появление красной окраски свидетельствует об образовании индола.

Субстратами аммонификации могут быть и более простые органические соединения азота, например мочевины. Ферментативный гидролиз мочевины до аммиака и углекислоты способны осуществлять микроорганизмы, образующие уреазу. Образовавшийся аммиак используется этими бактериями в качестве источника азота. Процесс аммонификации мочевины сопровождается сильным подщелочением среды.

Для выявления способности микроорганизмов использовать мочевины часто применяют среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ — 5,0; K_2HPO_4 — 0,5; яблочнокислый, лимоннокислый или виннокислый Na — 5,0. Среду без мочевины наливают в конические колбы тонким слоем и стерилизуют при 0,5 ати. Мочевину добавляют к стерильной среде в виде более концентрированного раствора в подкисленной дистиллированной воде, простерилизованного также при 0,5 ати. После засева среды микроорганизмами под ватной пробкой укрепляют стерильную полоску красной лакмусовой бумаги. Продолжительность культивирования 3—5 суток. Образование аммиака обнаруживают по изменению цвета лакмусовой бумаги, а также качественной реакцией с реактивом Несслера.

Использование азота минеральных солей. Способность микроорганизмов использовать соли аммония или нитраты в качестве источника азота проверяют на синтетических средах. Готовят два варианта среды. Состав основной среды (г/л): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; NaCl — 0,5; раствор микроэлементов (с. 155) — 1 мл; агар — 15,0; pH 7,1—7,2. В первом варианте к основной среде добавляют NH_4Cl — 1,0 и CaCO_3 — 5,0, так как хлористый аммоний — физиологически кислая соль (с. 44), во втором варианте (KNO_3 — 1,0. Среды разливают в пробирки, стерилизуют при 0,5 ати и после стерилизации скашивают. Посев проводят штрихом, продолжительность культивирования — 2—10 суток. Рост или его отсутствие отмечают визуально.

Способность усваивать аммонийные соли или нитраты можно проверить и на жидких средах того же состава. В этом случае по окончании опыта целесообразно установить полноту использова-

¹ Триптофан добавляют к стерильному бульону в виде раствора, который готовят следующим образом. Триптофан вносят в воду и прибавляют по каплям 5—10%-ный раствор NaOH до полного его растворения. Раствор триптофана стерилизуют при 0,5 ати в течение 15 мин.

ния данной соли. С этой целью в культуральной жидкости определяют присутствие ионов аммония или нитратов качественными реакциями (с. 159, 164). Для контроля проводят реакции с соответствующей стерильной средой.

9.2.3. Использование молекулярного азота

О способности аэробных микроорганизмов использовать молекулярный азот можно судить по их росту на безазотистой среде Эшби, которая имеет следующий состав (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; pH 7,1—7,3. Среду разливают в пробирки, стерилизуют при 0,5 ати и готовят скошенный агар. Посев проводят штрихом. Продолжительность культивирования — 7—10 суток. Необходимо отметить, что на среде Эшби могут расти не только микроорганизмы, фиксирующие молекулярный азот, но и олигонитрофилы, т. е. микроорганизмы, способные усваивать ничтожные количества связанного азота, содержащегося в реактивах, воде и воздухе. Обильный рост на среде Эшби может свидетельствовать о принадлежности бактерий к азотфиксаторам.

Молекулярный азот могут фиксировать и анаэробные бактерии. Для выявления этой способности у представителей рода *Clostridium* используют среду следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт — 0,015; глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 11,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5; $NaCl$, $MnSO_4$ и $FeSO_4$ — следы (по 1 мл 1%-ного раствора каждой соли); $CaCO_3$ — 20,0; pH 7,0. Среду разливают в высокие пробирки и стерилизуют при 0,5 ати. После стерилизации пробирки доливают почти до пробки стерильной средой и прогревают на кипящей водяной бане в течение 20—30 мин для удаления растворенного в среде кислорода. Затем среду в пробирках быстро охлаждают под струей холодной воды и проводят посев суспензией микроорганизмов. Посевной материал вносят пипеткой на дно пробирки. Продолжительность культивирования — 2—7 суток. По окончании опыта отмечают рост азотфиксаторов (помутнение среды, образование газа, появление запаха масляной кислоты) или его отсутствие.

9.2.4. Отношение к молекулярному кислороду и рост в анаэробных условиях

По отношению к молекулярному кислороду среди микроорганизмов выделяют группы облигатных аэробов и микроаэрофилов, факультативных, азотолерантных и строгих анаэробов. Чтобы судить о принадлежности микроорганизмов к той или иной группе, микробную суспензию высевают в пробирки с расплавленной и остуженной до 40—45°C агаризованной питательной средой. Посев можно проводить и уколом. Строгие аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое. Микроаэрофилы — на некотором расстоянии от поверхности. Факультативные анаэробы обыч-

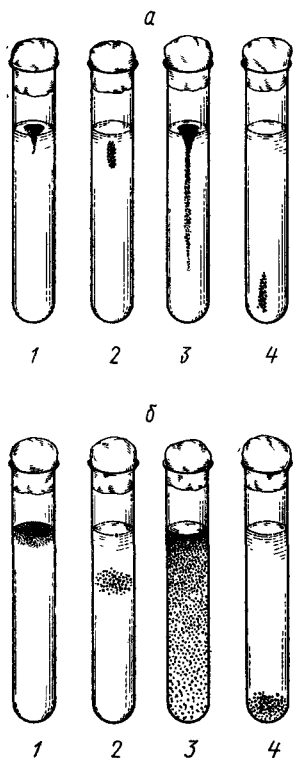


Рис. 65. Рост микроорганизмов при посеве уколом (а) и при посеве в расплавленную плотную среду (б):
 1 — аэробы; 2 — микроаэрофилы; 3 — факультативные анаэробы; 4 — анаэробы

но развиваются по всей толще среды. Строгие анаэробы растут только в глубине среды, у самого дна пробирки (рис. 65).

Факультативные анаэробы хорошо растут и в аэробных, и в анаэробных условиях. В анаэробных условиях многие из них способны использовать в качестве конечного акцептора электронов не кислород, а нитраты. В ходе этого процесса, называемого нитратным дыханием, нитраты восстанавливаются до нитритов, и далее до N_2O и газообразного азота. В случае образования этих газообразных продуктов говорят о денитрификации. Другие факультативные анаэробы могут в анаэробных условиях переклещаться с дыханием на брожение, и тогда в средах с углеводами накапливаются значительные количества органических кислот и других продуктов метаболизма.

Определение способности к аэробному дыханию. Тест на дыхание (поглощение молекулярного кислорода) проводят с использованием полярографа и платина-хлорсеребряного электрода «закрытого» типа, позволяющего регистрировать дыхание в небольших по объему образцах. Полярограф представляет собой прибор с термостатированной перемешиваемой ячейкой для определения дыхания и автоматической регистрации изменения силы тока, линейно связанной с концентрацией кислорода в ячейке. Следует помнить, что концентрация кислорода в ячейке зависит от темпера-

туры, молярности буфера и атмосферного давления. При комнатной температуре (21°) и нормальном давлении (760 мм рт. ст.) в литре дистиллированной воды, насыщенной воздухом, растворено 7 мг кислорода, что соответствует примерно 500 натомов O_2 /мл.

Для измерения скорости дыхания клетки аэробных микроорганизмов, выращенные на соответствующих средах, собирают центрифугированием (режим зависит от величины клеток), промывают физиологическим или буферным раствором с оптимальным для данного объекта pH и суспендируют в небольшом объеме буфера из расчета примерно 3 мл на 1 г осадка сырых клеток. Клетки в течение эксперимента хранят на льду. В ячейку полярографа вно-

сят клетки (обычно 0,1 объема ячейки) и добавляют проаэрированный буфер той же температуры. Регистрацию поглощения кислорода следует проводить в термостатированных ячейках при температуре, близкой температуре выращивания испытуемого микроорганизма. Регистрируют поглощение O_2 пробой без субстрата (эндогенное дыхание), затем шприцем добавляют соответствующий субстрат (обычно 10^{-2} — 10^{-3} М). Регистрацию ведут в течение нескольких минут, причем в первый период времени после добавления субстрата дыхание должно быть линейным, т. е. его скорость не должна изменяться со временем. Если такой линейности не наблюдается, можно попытаться снизить концентрацию клеток или увеличить скорость движения ленты самописца.

В качестве теста на функционирование терминальных оксидаз можно добавить в ячейку с клетками ингибиторы, цианид или азид (*Внимание! Сильнейшие яды!*). Их добавляют до конечной концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М, в таких условиях клетки теряют способность поглощать кислород.

Расчет скорости дыхания проводят по ленте самописца, учитывая скорость поглощения клетками кислорода в первые 1—3 мин после добавления субстрата; рассчитывают также степень подавления дыхания (в %) при той или иной действующей концентрации ингибитора. Данные рассчитывают на миллиграмм общего клеточного белка (см. гл. 8).

Для калибровки шкалы полярографа проводят измерения содержания кислорода в насыщенной воздухом дистиллированной воде (100% кислорода) и в той же пробе после добавления 10^{-2} М дитионита натрия (0% кислорода).

Способность к денитрификации определяют на среде следующего состава (г/л): глицерин — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 2,0; KNO_3 — 10,0; K_2HPO_4 — 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,025; NaCl — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001; агар — 1,0. Среду разливают в пробирки по 5 и 10 мл и стерилизуют при 0,5 ати. Исследуемый микроорганизм вначале засевают в пробирки с 5 мл среды (1-й пассаж). Посев делают уколом. Через 24 ч петлю культуры 1-го пассажа переносят в пробирки с 10 мл среды, которую предварительно расплавляют и охлаждают до 40—45°. После внесения микроорганизмов среду перемешивают, остужают и заливают 2—3 мл стерильного 1%-ного водного агара для создания анаэробных условий. Рост бактерий, способных к денитрификации, сопровождается помутнением среды и выделением газа.

Проверить способность бактерий к восстановлению нитратов можно и на МПБ, к которому добавляют 0,2% KNO_3 . Среду разливают в пробирки по 10 мл, опускают на дно каждой поплавки и стерилизуют при 1 ати. Посев проводят суспензией клеток. Продолжительность культивирования — 2—5 суток. По окончании опыта отмечают накопление в поплавке газа (N_2) и определяют качественными реакциями присутствие в культуральной жидкости нитратов и нитритов.

Реакция на нитраты с дифениламином. На фарфоровую пластинку наносят каплю концентрированной серной кислоты, помещают в нее несколько кристаллов дифениламина и после его растворения добавляют каплю исследуемой жидкости. При наличии ионов NO_3^- жидкость окрашивается в темно-синий цвет. Следует иметь в виду, что азотистая кислота также дает с дифениламином синее окрашивание. Поэтому пробу на нитраты можно проводить только при отсутствии в среде нитритов.

Крахмал-йодная реакция на нитриты основана на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, присутствие которого обнаруживают с крахмалом. Для проведения реакции к капле культуральной жидкости добавляют каплю раствора, содержащего ZnCl_2 , KI и крахмал (приготовление реактива см. Приложение), и каплю раствора HCl . При наличии в среде нитритов появляется синее окрашивание.

Реакция на нитраты с реактивом Грисса основана на образовании в кислой среде в присутствии нитритов и ароматических аминов (сульфофеноловой кислоты и α -нафтиламина) азосоединения, окрашенного в красно-розовый цвет. Для проведения реакции к капле реактива Грисса (приготовление реактива см. Приложение) добавляют каплю культуральной жидкости. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии нитритов. Параллельно проводят реакции со стерильной средой.

Определение способности к брожению проводят обычно на углеводно-пептонной среде с относительно высокой концентрацией углеводов и небольшим количеством пептона. Состав среды (г/л): углевод — 10,0; пептон — 2,0; NaCl — 5,0; K_2HPO_4 — 0,3; агар — 3,0. На 100 мл среды добавляют 0,3 мл 1%-ного водного раствора бромтимолового синего, рН среды 7,1—7,2. Среду без углевода стерилизуют при 1 ати. Углеводы (глюкозу, сахарозу, лактозу) добавляют к стерильной расплавленной среде в виде растворов в дистиллированной воде, которые стерилизуют при 0,5 ати. Стерильную среду с углеводами разливают в стерильные пробирки слоем 5—6 см и после того, как она застынет, ее засевают исследуемым микроорганизмом. Посев делают уколом. Для каждого углевода используют две пробирки. После посева поверхность среды в одной пробирке заливают стерильным расплавленным парафином, смесью вазелинового масла и парафина (1:1), или водным агаром (1,5 г агара на 100 мл), слоем 1—2 см.

Продолжительность культивирования от 2 до 7 суток. По окончании опыта регистрируют изменение рН среды по перемене цвета индикатора. Аэробные микроорганизмы, осуществляющие дыхание и не способные к брожению, растут на поверхности среды только в пробирке без парафина и образуют небольшое количество кислот лишь в верхнем слое среды. В случае нейтрализации этих кислот продуктами разложения пептона в поверхностном слое среды наблюдается щелочная реакция. Микроорганизмы, способные сбраживать углеводы, растут и образуют кислоты в обеих пробирках, но кислотность в анаэробных условиях значи-

тельно выше, чем в первом варианте. Это хорошо заметно по изменению цвета индикатора. Если брожение сопровождается образованием газов, то происходит разрыв агаризованной среды.

9.2.5. Определение внеклеточных ферментов

Как указывалось выше, некоторые микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов самые различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Однако макромолекулы не могут проникать через мембрану клетки. Они подвергаются расщеплению, которое осуществляется под воздействием экзоферментов, относящихся к классу гидролаз. Большинство из них катализирует гидролиз полимера до растворимых продуктов, обычно димеров или мономеров, которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов. Образование экзоферментов широко распространено среди различных групп микроорганизмов. При поиске продуцентов ферментов-гидролаз в лабораторной практике применяют специальные методы. Сущность их состоит в следующем. Микроорганизмы выращивают на агаризованной среде, содержащей макромолекулярный субстрат. Если клетки выделяют в среду экзоферменты, гидролизующие данное соединение, то выросшие колонии окружены зоной, в которой обнаруживаются продукты гидролиза.

Амилолитическая активность. Крахмал подвергается гидролитическому расщеплению под действием амилаз, активными продуцентами которых являются различные виды бацилл, псевдомонад, стрептомицетов и мицелиальных грибов. Для выявления амилолитической активности часто используют среду следующего состава (г/л): пептон — 10,0; K_2HPO_4 — 5,0; растворимый крахмал — 2,0; агар — 15,0, pH среды 6,8—7,0. Среду стерилизуют при 1 атм и разливают в стерильные чашки Петри. Когда среда застынет, исследуемые микроорганизмы высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2—10 суток. Гидролиз крахмала обнаруживают после обработки агаровой пластинки раствором Люголя (приготовление реактива см. Приложение). 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 миллиметрах от края штриха (колонии) до границы светлой зоны. Чем больше диаметр светлой зоны, тем выше амилолитическая активность (рис. 66).

Протеолитическая активность. Протеолитические ферменты (протеазы) катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и другими микроорганизмами.

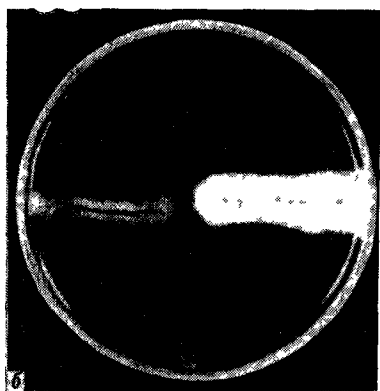
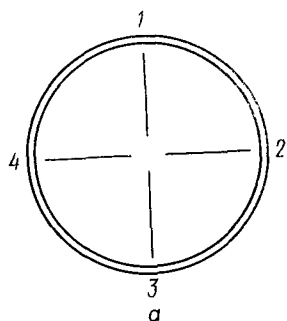


Рис 66 Определение амилотической активности:
а — схема посева (1—4 — штрихи разных культур); *б* — среда с культурами после обработки раствором Люголя

Активность внеклеточных протеаз определяют, используя в качестве субстрата желатину, казеин или другие белки.

Протеолиз желатины. Микроорганизм высевают на мясо-пептонную желатину (МПЖ). Ее готовят следующим образом. К 100 мл МПБ добавляют 10—15 г желатины, оставляют на 20—30 мин, чтобы желатина набухла, затем смесь нагревают на водяной бане до полного растворения желатины и разливают полученную МПЖ в пробирки по 8—10 мл. Стерилизуют при 0,5 ати 15 мин. Посев проводят уколом. Продолжительность культивирования 7—10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины или его отсутствие отмечают визуально. Если желатина разжижается, указывают интенсивность и форму разжижения — послойное, воронкообразное, мешковидное, пузыревидное и т. д. (рис. 67).

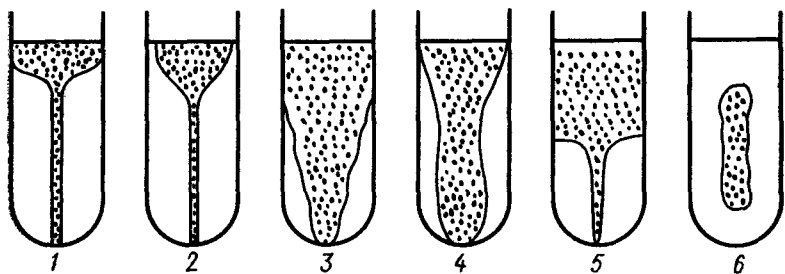


Рис. 67. Схема разжижения желатины микроорганизмами при посеве уколом:

1 — кратеровидное; 2 — реповидное; 3 — воронковидное; 4 — мешковидное; 5 — послойное; 6 — пузыревидное. 1—3 и 5 — разжижение вызвано аэробами, 4 — факультативными анаэробами, 6 — анаэробами

Протеолиз казеина. Для выявления этой способности используют молочный агар — среду, состоящую из равных частей стерильного обезжиренного молока и стерильного 3%-ного водного агара. Как правило, перед приготовлением среды молоко обезжиривают центрифугированием в течение 15 мин при 2—3 тыс. об/мин. Жиры, которые образуют на поверхности молока достаточно плотную пленку, удаляют, а молоко стерилизуют при 0,5 ати. После стерилизации его подогревают и добавляют при постоянном перемешивании к стерильному расплавленному и охлажденному до 50° водному агару. Полученную среду разливают в чашки Петри. Микроорганизмы высевают штрихом по диаметру чашки или уколом. Продолжительность культивирования 2—10 суток. Гидролиз казеина обнаруживают по зоне просветления среды вокруг колонии или выросших по штриху микроорганизмов. Особенно четко она видна после обработки среды 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.

Липолитическая активность. Липиды подвергаются гидролитическому разложению под действием липаз. Продуценты липаз обнаружены среди дрожжей, мицелиальных грибов, бактерий рода *Clostridium* и других микроорганизмов. Для выявления липолитической активности исследуемые микроорганизмы высевают на среду, содержащую соответствующий липид. Определенная трудность при постановке таких опытов связана с тем, что жиры не смешиваются с водой. Поэтому чаще всего вместо жиров в среду вводят твины — эфиры жирных кислот и сорбита. Твин-40 содержит пальмитиновую, твин-60 — стеариновую, а твин-80 — олеиновую кислоты. Твины хорошо растворимы в воде и имеют нейтральную реакцию. Состав среды (г/л): твин — 10,0; пептон — 10,0; NaCl — 5,0; CaCl₂·H₂O — 0,1; агар — 20,0; pH среды 7,4. Готовят среду без твина и стерилизуют ее при 1 ати. Водный раствор твина соответствующей концентрации стерилизуют отдельно при 0,5 ати и добавляют к стерильной основной среде. Среду разливают в чашки Петри. Когда агар застывает, на поверхность агаровой пластинки высевают штрихом или уколом исследуемый микроорганизм. Засеянные чашки Петри выдерживают при соответствующей температуре необходимое для роста микроорганизма время. На наличие липазы указывает образование вокруг штриха или колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из твина.

9.2.6. Образование антибиотиков

В процессе жизнедеятельности многие микроорганизмы образуют специфические продукты, которые обладают высокой физиологической активностью по отношению к другим микроорганизмам или вирусам, задерживая их рост или убивая их. Они назы-

ваются антибиотиками. В отличие от общебиологических ядов антибиотики проявляют свое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определенным видам или группам микроорганизмов. Одни антибиотики — пенициллин, фузагиллин, бацитрацин и др. — подавляют рост ограниченного числа видов микроорганизмов. Другие — тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин, карбомицин — имеют широкий спектр действия, т. е. подавляют рост многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также риккетсий и некоторых вирусов. Как правило, грамположительные бактерии более чувствительны к действию антибиотиков по сравнению с грамотрицательными, что связано со строением их клеточной стенки. Наиболее часто активные продуценты антибиотических веществ встречаются среди стрептомицетов, спорообразующих бактерий и мицелиальных грибов.

Определение антибиотической активности микроорганизмов.

Существуют различные способы выявления антибиотических свойств микроорганизмов. Многие из них основаны на способности антибиотиков диффундировать в агаризованные среды и образовывать зоны, в которых не растут тест-организмы. Величина зоны отсутствия роста указывает на степень активности данного антибиотика в отношении тест-культуры и зависит от его концентрации, а также от плотности культуры тест-организма, состава и толщины слоя агаризованной среды, температуры инкубации, длительности диффузии и других факторов. В качестве тест-организмов используют представителей различных микроорганизмов, в первую очередь *Escherichia coli* (граммотрицательные бактерии), *Staphylococcus aureus* (грамположительные бактерии), *Bacillus subtilis* или *Bacillus mycoides* (спорообразующие бактерии), дрожжи рода *Candida* или *Saccharomyces*. При необходимости этот стандартный набор тест-организмов дополняют другими микроорганизмами. Антибиотическую активность чаще всего выявляют методами перпендикулярных штрихов и агаровых блочков.

Метод перпендикулярных штрихов. На питательный агар в чашке Петри высевают штрихом предполагаемый продуцент антибиотического вещества. Посев штрихом делают по диаметру чашки Петри. Время инкубации продуцента зависит от скорости его роста. После того как продуцент вырастет и образует антибиотическое вещество, диффундирующее в толщу агара, перпендикулярно к его штриху подсевают штрихами тест-организмы, начиная от штриха к периферии чашки. Для посева используют густые суспензии тест-организмов в стерильной водопроводной воде. Чашки выдерживают в термостате при 18—30° в течение 2—8 суток в зависимости от скорости роста тест-организмов. Не чувствительные к антибиотическому веществу тест-организмы растут вблизи штриха продуцента. Если антибиотик оказывает действие на тест-организм, то рост последнего будет наблюдаться вдали от штриха продуцента (рис. 68). Чем больше это расстояние, тем более чувствительным является тест-организм к антибиотическому веществу, образуемому изучаемым продуцентом.

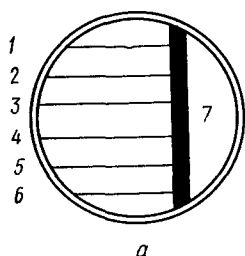
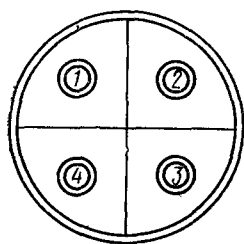


Рис 68 Определение антибиотической активности методом перпендикулярных штрихов
a — схема посева (1—6 — штрихи тест-культур, 7 — штрих продуцента антибиотического вещества); *б* — рост продуцента и тест-культур

Метод имеет, однако, существенный недостаток. Продуцент антибиотического вещества и тест-организм выращивают на одной среде, хотя известно, что не всегда одна и та же среда одинаково благоприятна как для продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организма.

Метод агаровых блочков предусматривает использование разных питательных сред для выращивания продуцента антибиотика и тест-организмов. Для выявления антибиотических свойств актиномицетов предполагаемый продуцент выращивается на среде следующего состава (г/л): глюкоза — 30,0; KNO_3 — 5,5; MgSO_4 — 0,5; NaCl — 1,0; K_2HPO_4 — 0,4; ZnSO_4 — 0,002; FeSO_4 — 0,002; агар — 25,0; вода дистиллированная; pH 7,1—7,2. Среду стерилизуют при 0,5 ати и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания агара продуцент антибиотического вещества высевают сплошным газоном. Для этого споры актиномицета переносят петлей на агаровую пластинку, распределяют по всей поверхности шпателем и инкубируют при 28—30° в течение 8—10 суток. Затем стерильным пробочным сверлом (диаметр 6—8 мм) вырезают агаровые блочки с газоном актиномицета и переносят их на поверхность агаризованной среды, например МПА, только что засеянной тест-организмом. Агаровые блочки раскладывают по шаблону на равном расстоянии один от другого и на расстоянии 1,5—2 см от края чашки мицелием вверх и плотно прижимают к агаровой пластинке. Для лучшей диффузии антибиотических веществ в толщу питательной среды, засеянной тест-организмом, блочки можно закладывать непосредственно в лунки, предварительно вырезанные тем же сверлом. На одной чашке Петри с тест-организмом можно разместить 5—6 агаровых блочков с разными продуцентами антибиотиков (рис. 69). Чашки выдержива-



а

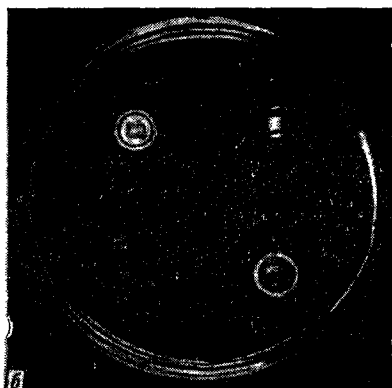


Рис 69. Определение антибиотической активности методом агаровых блочков

а — схема постановки опыта (1—4 — блочки с разными продуцентами); *б* — зоны подавления роста тест-культуры под действием антибиотика, диффундирующего в агар блочков

ют 1 ч при комнатной температуре для диффузии антибиотических веществ в толщу агара, затем помещают в термостат при температуре, благоприятной для развития тест-организма на сутки и более в зависимости от скорости его роста. Если тест-организм чувствителен к антибиотическому веществу продуцента, то после инкубации вокруг агаровых блочков образуются зоны отсутствия его роста. Чем больше выделяется антибиотика и чем он активнее, тем больше будет диаметр зоны отсутствия роста тест-организма. Тест-организм, не чувствительный к антибиотическому веществу данного продуцента, растет по всей поверхности среды и даже вблизи блочка продуцента.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотическим веществам. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам удобно определять с помощью выпускаемых промышленностью бумажных дисков, пропитанных определенными антибиотиками. Концентрация антибиотиков в дисках подобрана с таким расчетом, чтобы диаметры задержки роста стандартных тест-организмов были 28—32 мм.

Исследуемые микроорганизмы выращивают на соответствующей плотной питательной среде. Готовят однородную суспензию клеток в стерильной водопроводной воде. В 1 мл суспензии должно содержаться около 2 млрд клеток¹. 1 мл суспензии вносят в пробирку с 20 мл стерильной расплавленной и остуженной до 50° агаризованной средой, например МПА. Если микроорганизмы выращивали в жидкой питательной среде, в агар вносят соответствующий объем культуры. Содержимое пробирки быстро и тща-

¹ Определяют по стандарту мутности

тельно перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри. Когда среда застынет, на ее поверхности помещают бумажные диски на равном расстоянии друг от друга и на 1,5—2,0 см от края чашки. Чашки выдерживают 2 ч при комнатной температуре для лучшей диффузии антибиотиков в толщу агаризованной среды, а затем 24 ч при 28—30°. Если исследуемые микроорганизмы чувствительны к данным антибиотикам, то вокруг дисков образуются зоны отсутствия роста. Диаметр зоны измеряют миллиметровой линейкой. Зона более 30 мм свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизма к антибиотику, а менее 12 мм — о слабой чувствительности.

Когда в распоряжении экспериментатора имеются растворы антибиотических веществ или культуральные жидкости, содержащие антибиотик, используют метод с применением лунок в толще агара. В этом случае в застывшей агаризованной среде, засеянной испытуемым микроорганизмом, стерильным пробочным сверлом (диаметр 6—8 мм) делают лунки на расстоянии 1,5—2 см от края чашки. В лунки вносят растворы антибиотиков или культуральную жидкость. Этот метод позволяет также выявить способность к образованию антибиотических веществ микроорганизмами, выращенными в жидкой среде.

ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Одно из центральных мест в современной биологии принадлежит генетике — науке о наследственности и изменчивости. Наследственность обеспечивает материальную и функциональную преемственность между поколениями организмов. Наследственная информация, необходимая для существования и воспроизведения организмов, заключена в генах, которые обладают тремя основными свойствами: они выполняют специфическую функцию, способны к точному самовоспроизведению, чрезвычайно стабильны. Гены расположены в линейном порядке на хромосомах, причем каждый ген занимает свое собственное место, или локус. Таким образом, основной структурой, обеспечивающей материальную основу наследственности, является хромосома — система линейно сцепленных генов, обеспечивающих хранение и передачу информации.

Прокариоты и эукариоты различаются генетической организацией. Наследственная информация у прокариот заключена в кольцевой молекуле ДНК, называемой бактериальной хромосомой. Кроме того, часть наследственной информации может находиться в плазидах — автономно реплицирующихся кольцевых ковалентнозамкнутых суперскрученных молекулах ДНК. У эукариот наследственная информация находится в хромосомах, расположенных в ядре. Экстрахромосомальная ДНК у эукариот может быть представлена плазидами, митохондриальной ДНК, хлоропластной ДНК.

Изменчивость организмов может быть наследственной и ненаследственной. Ненаследственная изменчивость (модификационная, фенотипическая) является адаптивной, приспособительной к изменению факторов внешней среды. Однако она является генетически детерминированной и находится в пределах нормы реакции организма. Таким образом, фенотип микроорганизма часто существенным образом определяется условиями его выращивания.

Наследственная изменчивость подразделяется на комбинативную и мутационную. При комбинативном типе изменчивости сами гены не изменяются, происходит лишь их перекомбинация и перекомбинация хромосом, несущих разные аллели. Комбинативная изменчивость определяет разнообразие потомков, получивших новые комбинации генов и хромосом, существовавших у родительских форм.

Несмотря на стабильность, гены обладают способностью подвергаться случайным внезапным изменениям, или мутациям, в результате чего появляются новые аллели, функционально отличные от исходного гена. Таким образом, мутационная изменчивость — это возникновение новых дискретных единиц генетического материала, прежде всего новых аллелей.

10.1 ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Каждый вид микроорганизма может быть представлен рядом штаммов. В генетике микроорганизмов термином «штамм» обозначают генетически однородную культуру определенного вида, выделенную из одной клетки и отличающуюся от других штаммов происхождением, а часто и рядом признаков, несущественных для систематики. Штамм, выделенный из природы, называют диким типом. Одним из основных методов генетического анализа микроорганизмов является метод клонирования культуры. Клон — это генетически однородное потомство, полученное при размножении одной клетки (у прокариот) или вирусной частицы. У эукариотических микроорганизмов клон — потомство одной клетки (споры), делящейся митотически.

Получение отдельных клонов позволяет изучать свойства генетически однородной совокупности клеток (популяции). На практике клоны получают из отдельных колоний микроорганизмов, выросших на поверхности плотной питательной среды из отдельных клеток (принцип одна клетка — одна колония).

В генетике микроорганизмов изучают свойства и признаки не отдельных клеток, а популяции в целом. Признаки микробных культур можно подразделить на морфологические, физиологические и биохимические (см. гл. 9). Совокупность всех проявляемых признаков определенного штамма называется его фенотипом. Наследственной основой фенотипа является генотип — наследуемая генетическая организация.

Перед проведением генетических экспериментов необходимо убедиться в чистоте штаммов, отклонировать их, вырастить в небольшом объеме среды и соответствующим образом проверить генотип этих штаммов. Наиболее широко используемыми объектами практических занятий по генетике микроорганизмов из бактерий являются *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, а из эукариот — некоторые виды грибов. Однако это не исключает использование и других генетически хорошо изученных микроорганизмов. В данном практическом руководстве рассматриваемые методики относятся главным образом к *E. coli*.

10.2 МУТАГЕНЕЗ

Мутации являются первоисточником наследственной изменчивости и наряду с генетической рекомбинацией поставляют материал для эволюции, а также искусственного отбора. Они представ-

ляют собой ценный инструмент в генетических и биохимических исследованиях.

1. Вызывая изменения в гене, а следовательно, и в фенотипе, мутации служат генетическими маркерами, позволяющими не только идентифицировать ген, но также локализовать его на хромосоме, плазмиде или другой молекуле ДНК в клетке с помощью методов генетического картирования.

2. Наличие набора мутаций помогает исследовать процессы метаболизма и механизмы их генетического контроля.

3. Исследование белков, измененных в результате мутаций, способствует установлению их структуры и функционирования.

4. Мутации являются основой для селекции штаммов микроорганизмов с полезными свойствами (например, штаммов — продуцентов антибиотиков).

По своему происхождению мутации могут быть спонтанными и индуцированными.

10.2.1. Спонтанные мутации

Спонтанные мутации возникают в естественных условиях в результате нормальных процессов в клетке или при взаимодействии клеток с окружающей средой. Мутагенным действием обладают неконтролируемые факторы внешней среды, например естественная радиация. Мутагенное действие могут оказывать также определенные компоненты питательных сред. Существенная роль в возникновении спонтанных мутаций принадлежит таким процессам, как рекомбинация, репликация и репарация. Спонтанные мутации в популяции клеток по разным генам возникают с очень низкой частотой (в пределах 10^{-5} — 10^{-7}). Однако если существует метод отбора (селекции) мутантного фенотипа, то оказывается возможным обнаружить даже крайне редкие спонтанные мутанты. При наличии таких методов отбора часто предпочтение отдается выделению именно спонтанных мутантов, поскольку многие мутагенные факторы являются потенциально опасными для человека, а химические мутагены, кроме того, загрязняют окружающую среду.

10.2.2. Индуцированные мутации

Физические, химические или биологические агенты, индуцирующие мутации, называются мутагенами. Мутагенным действием обладает ионизирующее излучение, УФ-лучи, ряд химических соединений, транспозирующиеся элементы и транспозон-подобные фаги (например, фаг Mu), а также мутации в определенных генах (гены-мутаторы).

10.2.3. Выбор мутагена

Выбор мутагена определяется типом мутации, которую желательно получить (т. е. замена основания, делеция, сдвиг рамки

считывания), а также эффективностью мутагена в отношении данного микроорганизма. Например, делеционные мутанты всегда имеют ярко выраженный фенотип, не бывают температурозависимыми и условно летальными; истинные реверсии к дикому типу у них невозможны. Разные виды микроорганизмов могут требовать разных доз и условий для эффективного мутагенеза. С этой целью перед экспериментатором следует построить кривую выживаемости клеток в зависимости от дозы мутагенного фактора или времени обработки.

В таблице 13 приведены некоторые мутагены, используемые для получения мутаций у микроорганизмов.

УФ-лучи. Простым и удобным методом получения мутантов разного типа у ряда микроорганизмов является УФ-облучение. Для этого используются любые источники света с максимумом испускания в коротковолновой области (около 254 нм), например бактерицидные лампы. Поскольку УФ-лучи являются относительно слабым мутагеном, то наилучшие результаты получают при низкой выживаемости клеток (0,1—1,0%). Необходимо помнить, что УФ-лучи практически полностью поглощаются стеклом, поэтому при облучении суспензию вегетативных клеток или спор помещают в открытый сосуд, например чашку Петри. Чтобы исключить эффект экранирования, следует использовать суспензии с концентрацией не выше $5 \cdot 10^8$ клеток/мл и проводить облучение в буферных растворах. Летальный эффект УФ-лучей зависит от физиологического состояния клеток, прежде всего от их возраста. Обычно в фазе экспоненциального роста культуры клетки более чувствительны к УФ-лучам, чем в стационарной фазе. Кроме того, облучение и дальнейшую инкубацию клеток микроорганизма следует проводить в условиях, исключающих фотореактивацию, т. е. в темноте.

Нитрозогуанидин. N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) является одним из самых мощных и широко применяемых мутагенов. Исходные растворы НГ готовят непосредственно перед использованием, растворяя его в соответствующем буфере (например, 0,1 М цитратный буфер, рН 5,5) до концентрации 1 мг/мл. Рабочая концентрация НГ составляет обычно 50—500 мкг/мл. Клетки (обычно из 5 мл культуры в экспоненциальной фазе роста) осаждают центрифугированием, промывают равным объемом цитратного буфера, ресуспендируют в 5 мл буфера, добавляют НГ и инкубируют при 30—37° в течение определенного времени. Время обработки подбирают предварительно таким образом, чтобы выживаемость клеток составляла примерно 50%. Клетки обрабатывают НГ в конечной концентрации 50—100 мкг/мл в течение 30 мин. Обработанные клетки осаждают центрифугированием, промывают фосфатным буфером (рН 7,0) или минимальной средой (см. Приложение), чтобы удалить НГ. После этого клетки переносят в богатую питательную среду (см. Приложение) и инкубируют в течение ночи (12—16 ч).

Свойства некоторых мутагенов, используемых для индукции мутаций у микроорганизмов

Мутаген	Механизм действия	Тип мутации	Эффективность	Характерные особенности
1	2	3	4	5
Радиация				
Рентгеновское излучение, быстрые нейтроны	преимущественно разрывы хромосомы	делеции, инверсии	средняя	требует специального оборудования
Уф-облучение	димеризация пиримидинов	транзиции, трансверсии, делеции	средняя	высокая частота индукции мутаций достигается только в условиях низкой выживаемости: фотореактивация должна быть предотвращена
Химические агенты				
Аналоги оснований: 2-аминопуриин, 5-бромурацил	ошибки в репликации ДНК	транзиции	низкая	слабый мутаген
Гидроксилламин	дезаминирование цитозина	транзиции	низкая	те же
Азотистая кислота	дезаминирование цитозина и аденина	транзиции, делеции	средняя	высокая частота мутаций достигается только в условиях низкой выживаемости
Нитрозогуанидин	алкилирование оснований в репликационной вилке	транзиции, трансверсии, с низкой частотой делеции	очень высокая	опасен в обращении, высокая частота вторичных мутаций

1	2	3	4	5
Этилметансульфонат	алкилирование гуанидина	транзиции, трансверсии	высокая	опасен в обращении, по сравнению с нитрозогуанидином — меньше вторичных мутаций
Акридиновые красители, бромистый этидий	интеркаляция между основаниями во время репликации ДНК	мутации со сдвигом рамки, небольшие вставки, делеции	низкая	эффективен при излечивании клеток от плазмид
Биологические агенты				
Гены-мутаторы	нарушение процессов репликации и репарации ДНК	транзиции, трансверсии	средняя	необходимо генетическое конструирование штаммов
Транспозлирующиеся элементы (IS-элементы, трансозоны, фаг Mu и др.)	встраивание в ДНК	вставки, изредка делеции	очень высокая	необходимо генетическое конструирование штаммов и/или векторов

Азотистая кислота. Раствор азотистой кислоты готовят непосредственно перед использованием, растворяя нитрат натрия в 0,1 М Na-ацетатном буфере (рН 4,6) до конечной концентрации 0,05 М.

Клетки (обычно из 5 мл культуры в экспоненциальной фазе роста) осаждают центрифугированием, промывают равным объемом Na-ацетатного буфера, ресуспендируют в 1 мл раствора азотистой кислоты и инкубируют при 30—37° в течение определенного времени. Время обработки подбирают предварительно таким образом, чтобы выживаемость клеток составляла 0,01—0,1%. Клетки обрабатывают азотистой кислотой в течение 10—20 мин. После окончания инкубации к клеткам добавляют 5—10 мл минимальной среды, чтобы остановить реакцию. Затем клетки осаждают центрифугированием, ресуспендируют в 10 мл богатой питательной среды и выращивают в течение ночи.

Алкилирующие агенты. Из алкилирующих соединений в качестве мутагена наиболее широко используют этилметансульфонат (ЭМС). Клетки (обычно из 5 мл культуры в поздней экспоненциальной фазе роста) осаждают центрифугированием и ресуспендируют в 2 мл минимальной питательной среды без источника углерода, содержащей 0,2 М *трис*-НСl (рН 7,5). К суспензии клеток добавляют 0,03 мл ЭМС, энергично перемешивают до его полного растворения и инкубируют при 30—37° в течение 1—2 ч (желательно на качалке). Затем к суспензии клеток добавляют 10—15 мл минимальной или богатой питательной среды и инкубируют в течение ночи.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С МУТАГЕНАМИ

Физические и химические мутагены не только увеличивают частоту мутаций: многие из них обладают канцерогенным действием, способным вызвать опухоли у млекопитающих. Кроме того, химические мутагены при попадании на кожу или внутрь могут привести к ожогам и отравлению.

При работе с мутагенами следует строго соблюдать следующие правила:

1. Любую работу с химическими мутагенами необходимо проводить в вытяжном шкафу, рабочая поверхность которого застелена фильтровальной бумагой.

2. Руки должны быть защищены резиновыми или пластиковыми перчатками.

3. Растворы мутагенов нельзя засасывать ртом; следует использовать автоматические пипетки или пипетки с резиновой грушей.

4. Растворы мутагенов нельзя сливать в раковину; лучше пропитать ими соответствующие твердые материалы (такие, как вермикулит) и поместить в герметичный контейнер, подобно другим опасным отходам.

5. При работе с источниками УФ-лучей следует защищать глаза стеклянными очками.

10.2.4. Экспрессия мутаций

У микроорганизмов в экспоненциальной фазе роста культуры скорость деления хромосомы (у бактерий) или ядер (у эукариотических клеток) обычно опережает скорость деления клеток. Поэтому для проявления возникших мутаций, большинство из которых являются рецессивными, необходим так называемый сегрегационный лаг-период, в течение которого происходит образование клеток, содержащих только мутантные хромосомы или ядра. Кроме того, для проявления некоторых мутаций необходим дополнительный фенотипический лаг-период. Например, для проявления мутаций устойчивости к фагу у *E. coli* необходимо, чтобы все рецепторы клеточной стенки заменились на мутантные. Это происходит только после двенадцати дополнительных делений. В связи с этим суспензию клеток микроорганизма, обработанную мутагеном, необходимо подрастить в течение определенного периода времени. Длительность этого периода зависит как от скорости деления клеток, так и от специфики роста. Например, для микроорганизмов, клетки которых при росте образуют цепочки или гроздь, этот период больше, чем для штаммов, растущих в виде одиночных клеток.

Таким образом, после подращивания клеток не все мутанты, которые обнаруживаются в культуре, являются независимыми, т. е. часть мутантных клеток происходит от одной исходной мутантной клетки в результате ее размножения. Поэтому, чтобы получить ряд независимых мутантов, культуру после обработки мутагеном необходимо разделить на ряд субкультур и из каждой субкультуры отбирать только по одному мутанту.

10.3. ОТБОР МУТАНТОВ

10.3.1. Прямой отбор мутантов

Использование селективных сред, т. е. сред, на которых способны расти клетки только определенного фенотипа, позволяет в ряде случаев проводить прямой отбор мутантов. К таким мутантам относятся клетки, приобретшие устойчивость к какому-либо веществу, например, антибиотику, токсичному соединению или фагу. Во всех этих случаях селективная среда должна содержать соответствующую добавку (например, антибиотик), подавляющую рост клеток дикого типа. Кроме того, прямым отбором могут быть выделены мутанты, способные к утилизации нетрадиционных источников углерода или азота. В данном случае, наоборот, в селективной среде должен отсутствовать какой-либо фактор, необходимый для роста клеток дикого типа.

Существенной особенностью при прямом отборе мутантов является выбор оптимальной концентрации селективного агента, в

которой он подавляет рост клеток дикого типа, но в то же время позволяет расти устойчивым к ним мутантам. Поэтому предварительно рекомендуется определить кривую выживаемости клеток в зависимости от концентрации селективного агента.

С помощью селективных сред можно также отбирать клетки-ревертанты, т. е. клетки, у которых в результате обратных мутаций, истинных или супрессорных, произошло восстановление свойств штамма дикого типа. Метод прямого отбора обладает высокой чувствительностью, поскольку позволяет выявлять редкие мутантные клетки на фоне немутировавших клеток.

10.3.2. Непрямой отбор мутантов

Использование индикаторных сред. Индикаторные среды, т. е. среды, на которых колонии микроорганизма с разными фенотипами отличаются по внешнему виду, широко используются в генетике микроорганизмов, в частности, для непрямого селекции мутантов. Они позволяют различать фенотипы по цвету колоний. Индикаторные среды бывают двух типов: с индикаторами на использование веществ и с хромогенными субстратами.

Среды с индикаторами на использование веществ содержат какой-либо углевод (например, лактозу) и индикатор (хлорид трифенилтетразолия, эозин-метиленовый синий, индикатор Мак-Конки и другие), меняющий свой цвет в зависимости от рН среды.

На среде с лактозой и трифенилтетразолием клетки *E. coli*, использующие лактозу, образуют кислоты и понижают рН среды. При низких значениях рН восстановления трифенилтетразолия не происходит и колонии имеют нейтральный или белый цвет. Колонии, состоящие из клеток, не способных использовать лактозу, имеют ярко-красную окраску. Напротив, на среде с индикатором Мак-Конки, содержащей лактозу, колонии, клетки которых способны использовать ее, приобретают темно-красный цвет. Клетки, не способные использовать лактозу, образуют колонии белого цвета.

Применение индикаторных сред пригодно для поиска любых мутантов, если имеется возможность различать колонии мутантов по изменению их окраски. С помощью индикаторных сред можно, например, выявлять мутанты по фосфатазной, нуклеазной или протеолитической активности.

Важной особенностью метода индикаторных сред является подбор оптимального разведения культуры при посеве на агаризованные среды. Количество колоний на чашке не должно быть слишком большим (обычно не более 100), иначе фенотипы соседних колоний (например, из-за подкисления среды) могут быть выражены нечетко.

Среды с хромогенными субстратами содержат специальные субстраты, разлагающиеся с образованием красителя при их гидролизе определенными ферментами, наличие которых

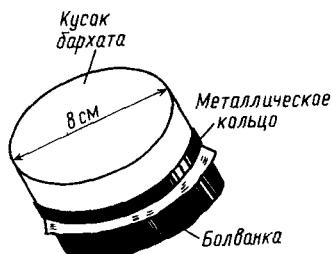


Рис 70 Репликатор

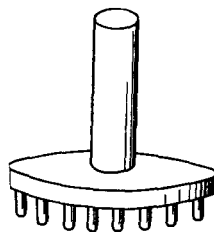


Рис 71 Игольчатый репликатор

тестируется. Такие субстраты либо просто добавляют в среду, либо опрыскивают ими среды в чашках после того, как на них выросли колонии. В качестве хромогенного субстрата широко используют X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид), с помощью которого обнаруживают наличие β -галактозидазы, одного из ферментов, необходимых для утилизации лактозы. Клетки, синтезирующие β -галактозидазу, расщепляют X-gal с образованием 5-бром-4-хлориндиго, который окрашивает колонии в ярко-синий цвет.

Метод отпечатков. Один из широко используемых методов выявления мутантов получил название метода отпечатков, или реплик. Чашки Петри с полноценной агаризованной неселективной средой засевают мутагенизированной культурой или суспензией клеток в соответствующем разведении, получая таким образом исходную матричную чашку. После появления колоний к поверхности среды в чашке прикасаются кусочком стерильного бархата, натянутого на цилиндрическую болванку (рис. 70). Вместо бархата можно пользоваться фильтровальной бумагой. На поверхность бархата переносятся (отпечатываются) клетки из колоний. После этого бархат прикладывают к поверхности среды в чашке или в чашках с селективными средами. Таким образом можно сделать до 10 отпечатков (реплик). Колонии, которые растут на неселективной среде, но не растут на какой-либо селективной среде, проверяют на наличие мутаций. Метод отпечатков за короткое время позволяет проверить тысячи колоний и особенно полезен для выявления ауксотрофов.

Исходную матричную чашку можно приготовить и иным способом: с помощью игольчатого репликатора (рис. 71). Таким стерильным игольчатым репликатором, имеющим 50—100 цилиндрических иголок, расположенных в определенном порядке, слегка прикасаются к поверхности неселективной среды в чашке. Эту операцию следует проводить аккуратно, чтобы иголки не прокалывали агар. Затем с помощью стерильных спичек или стерильных заостренных полосок толстой бумаги переносят клетки из колоний с чашек, на которых выросли мутагенизированные клетки, на матричную чашку на следы уколов. После инкубации матрич-

ной чашки до образования колоний с помощью того же репликатора делают отпечатки на ряд селективных сред.

10.3.3. Пенициллиновый метод обогащения мутантными клетками у бактерий

Возникновение мутаций, даже при их индукции сильными мутагенами, — относительно редкое событие. При прямых методах селекции это обстоятельство не играет существенной роли, поскольку с помощью селективных сред элиминируются все немутантные клетки. При использовании непрямых методов низкая частота мутирования может стать фактором, ограничивающим их разрешающую способность, поскольку поиск редких мутантных колоний приходится проводить на значительном фоне немутантных колоний. Повысить частоту мутантных клеток в популяции можно с помощью метода обогащения, элиминируя значительную часть немутантных клеток. При работе с бактериями чаще всего используют пенициллиновый метод обогащения. Пенициллин подавляет синтез клеточной стенки (муреина) и вызывает гибель только активно растущих клеток. Если культуру, содержащую мутантные (например, ауксотрофные) и немутантные клетки, выращивать на минимальной среде, то в такой среде будут размножаться только немутантные клетки. После внесения в такую среду пенициллина происходит гибель только немутантных клеток, и популяция обогащается мутантами. В оптимальных условиях можно достичь 1000-кратного обогащения культуры мутантами.

При использовании пенициллинового метода необходимо соблюдать ряд условий.

1. Обрабатываемая пенициллином суспензия или культура должна содержать не более 10^7 клеток/мл. При использовании более густых суспензий продукты лизиса клеток, погибших от пенициллина, могут служить источниками ростовых факторов для мутантных клеток, в результате чего они начнут расти и также подвергаться действию пенициллина.

2. Перед обработкой пенициллином бактерии должны быть проинкубированы в минимальной среде в течение времени, достаточного для 3—4 делений. За этот период происходит истощение эндогенных метаболитов в мутантных клетках, что предохраняет их от гибели в присутствии пенициллина.

10.4. ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ

У бактерий существуют три способа, или процесса, переиоса генетической информации, приводящие к рекомбинации генетического материала: трансформация, конъюгация и трансдукция, широко используемые в генетических экспериментах.

Трансформацией называют процесс переноса генетической информации, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает ее наследственные изменения.

При этом ДНК может представлять весь донорный геном либо его часть.

Передачу в клетку целого генома фага, приводящую к образованию в них зрелых фаговых частиц, называют трансфекцией. По способу переноса ДНК в бактериальную клетку этот процесс является трансформацией, однако в отличие от последней в результате трансфекции происходит лизис клетки, а не ее наследственное изменение.

Конъюгацией называют процесс переноса генетической информации из клетки-донора в клетку-реципиент, который осуществляется при непосредственном их контакте между собой.

Трансдукцией называют процесс переноса генетической информации из клетки-донора в клетку-реципиент, осуществляемый фагом.

Общим свойством всех трех процессов является их односторонность, т. е. всегда одна клетка выступает в роли донора ДНК, а другая — в роли реципиента. Взаимного (реципрокного) обмена генетической информацией у бактерий не происходит.

В экспериментальной работе наиболее часто используют методы, основанные на процессах трансформации и конъюгации.

10.4.1. Трансформация

Трансформация может осуществляться как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия генетического материала донора, называется трансформантом. Важное условие способности клетки к трансформации — развитие у нее особого физиологического состояния — компетентности. По развитию состояния компетентности микроорганизмы можно разделить на три группы.

1. Микроорганизмы, у которых компетентность возникает лишь в определенной фазе роста культуры (например, стрептококки, бациллы).

2. Микроорганизмы, клетки которых компетентны в любой фазе роста (например, гонококки, менингококки).

3. Микроорганизмы с отсутствием естественной компетенции. Клетки таких микроорганизмов становятся компетентными только после специальной обработки (например, клетки *E. coli* становятся компетентными после обработки на холоду хлористым кальцием).

Посев трансформированных клеток на селективные среды необходимо производить после определенного времени их инкубации в богатой питательной среде. В период такой инкубации в клетках-трансформантах происходит экспрессия полученных ими новых маркеров (генов) и они приобретают новый фенотип.

У ряда микроорганизмов с естественной компетентностью внутрь клетки проникает только односторонняя ДНК. Поэтому трансформация плазмидными ДНК, которые находятся в ковалентно-замкнутой суперскрученной форме, не осуществляется или осу-

ществляется с низкой эффективностью. Чтобы увеличить эффективность трансформации, следует предварительно получить протопласты клеток.

При проведении трансформации у бактерий с естественной стадией компетентности необходимо учитывать факторы, влияющие на такое состояние: температуру, состав среды и ее рН, наличие определенных концентраций двухвалентных катионов.

В последнее время распространение получил метод трансформации, названный электропорацией. Электропорация — введение ДНК в клетки с помощью электрических импульсов, создаваемых специальной аппаратурой. Электропорация является перспективным методом, поскольку позволяет вводить ДНК в клетки микроорганизмов, для которых системы трансформации неизвестны или осуществляются с низкой эффективностью.

Для различных микроорганизмов, у которых описан процесс трансформации, разработаны свои методы получения компетентных клеток и их трансформации. В данном руководстве мы приводим методику приготовления компетентных клеток *E. coli* штамма С600 и их трансформации плазмидными ДНК с высокой эффективностью.

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*. Имеется большое количество методов выделения препаратов плазмидной ДНК, пригодной без ее дальнейшей очистки для трансформации клеток *E. coli*. Одним из широко распространенных методов является метод выделения плазмидных ДНК с помощью лизиса клеток кипячением (Holmes, Quigley, 1981). Ниже приводится указанный метод в несколько модифицированном варианте.

Клетки из ночной культуры *E. coli* (1,5—5 мл) осаждают центрифугированием при 11 тыс. об/мин в течение 3 мин в пробирках Эппендорф. Супернатант тщательно сливают, а осадок ресуспендируют для лизиса в 350 мкл STET-буфера (8%-ная сахароза, 5%-ный тритон X-100, 50 мМ ЭДТА-Na₂, 50 мМ трис-HCl; рН 8,0). Добавляют 25 мкл раствора лизоцима в дистиллированной воде (10 мг/мл), перемешивают и инкубируют смесь при комнатной температуре в течение 5 мин. Пробирки переносят в кипящую водяную баню и инкубируют в течение 40 с. Затем полученные лизаты центрифугируют при 11 тыс. об/мин в течение 30 мин и образовавшийся осадок (лизированные клетки, денатурированные белки и денатурированная хромосомная ДНК) удаляют чистой спичкой или переносят супернатант в чистую пробирку. В пробирку добавляют 174 мкл 7,5 М раствора ацетата аммония и 300 мкл изопропилового спирта, перемешивают и инкубируют при —20° в течение 15 мин. В этих условиях происходит преципитация ДНК, тогда как неденатурированные белки остаются в растворе. Преципитат осаждают центрифугированием при 11 тыс. об/мин в течение 15 мин. Осадок дважды промывают 1,5 мл 70%-ного этанола, охлажденного до —20° (этанол следует аккуратно добавлять в пробирку, не перемешивая осадка; центрифугирование проводят, как указано выше, в течение 10 мин). Полученный

осадок (беловатый налет на дне пробирки) высушивают струей воздуха (можно использовать фен) и растворяют в 50 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА-Na₂, рН 7,5). При необходимости раствор ДНК следует хранить при -20°.

Получение компетентных клеток *E. coli*. Ночную культуру *E. coli* штамма С600, выращенную без аэрации, разводят в 20 раз теплой средой LB (см. Приложение) и инкубируют на качалке при 37° в течение 90—100 мин. Клетки осаждают центрифугированием на холоду, ресуспендируют в 1/2 объема 10 мМ раствора хлористого кальция при 4°, осаждают центрифугированием на холоду и ресуспендируют в 1/20 от исходного объема 100 мМ раствора хлористого кальция при 4°.

Приготовленные таким образом клетки *E. coli* сохраняют компетентность при их инкубации во льду в течение суток. Компетентность утрачивается даже при незначительном и кратковременном повышении температуры. Для более длительного хранения компетентным клеткам добавляют глицерин до конечной концентрации 15%, разливают аликвоты по 0,2 мл, замораживают и хранят при -2...-80°.

Трансформация компетентных клеток *E. coli*. К 0,2 мл компетентных клеток *E. coli* добавляют 1—10 мкл плазмидной ДНК (1—100 нг) и инкубируют клетки во льду в течение 30—45 мин. Затем клетки подвергают тепловому шоку, помещая их на 5—10 мин при 42°. Добавляют к клеткам 0,5 мл среды LB и инкубируют с аэрацией при 37° в течение 2 ч. После инкубации высевают по 0,1 мл культуры на чашки с селективной средой и инкубируют в течение 16—24 ч.

10.4.2. Конъюгация

Процесс конъюгации у бактерий обусловлен наличием в клетках-донорах определенных плазмид, названных конъюгативными. Конъюгативные плазмиды содержат в своем составе tra-гены. Эти гены кодируют формирование половых волосков-пилей, за счет которых происходит образование скрещивающихся (конъюгирующих) пар, обеспечивающих конъюгативный перенос плазмидной или хромосомной ДНК в клетку-реципиент. Плазмиды, не способные к конъюгативному переносу, называются неконъюгативными. Первой описанной конъюгативной плазмидой, обеспечивающей конъюгацию у *E. coli* К-12, является половой фактор F (fertility). Фактор F, существующий в автономном состоянии, способен с высокой эффективностью передаваться из клеток-доноров реципиентам. При интеграции полового фактора в хромосому *E. coli* образуются штаммы Hfr (high frequency of recombination), способные переносить хромосомную ДНК в реципиентные клетки. Реципиентные клетки, в которых происходит экспрессия генетического материала донора, называются трансконъюгантами.

При проведении экспериментов по конъюгации необходимо учитывать следующее.

1. Перенос конъюгативной плазмиды и хромосомы донора в случае Hfg-штаммов начинается с определенной точки на плазмиде, называемой *oriT*.

2. Перенос хромосомы донора происходит ориентированно, т. е. гены переносятся в той последовательности, в которой они расположены на хромосоме. Начало переноса связано с местом интеграции конъюгативной плазмиды в хромосому донорного штамма и ее ориентацией.

3. Скорость переноса хромосомных маркеров зависит от температуры, но в стандартных условиях скрещивания является величиной постоянной. Каждый генетический детерминант донора попадает в реципиентную клетку через определенное время после начала скрещивания.

4. Перенос является частичным. Во время передачи хромосомы происходят ее спонтанные разрывы. Поэтому возникающие зиготы содержат только часть генома донора и являются неполными (мезозиготы).

На использовании конъюгации основаны три метода генетического анализа у бактерий.

1. Определение частот рекомбинации между генетическими маркерами. Из-за очень высокой частоты кроссинговера маркеры, удаленные друг от друга на расстояние более трех минут переноса, ведут себя как несцепленные. Данный метод обладает высокой разрешающей способностью при анализе тесно сцепленных генов и при внутригенном картировании.

2. Определение последовательности генов на хромосоме по градиенту их передачи.

3. Локализация генов по времени их проникновения в реципиентную клетку — картирование методом прерывания конъюгации.

Мобилизация неконъюгативных плазмид. Определенные неконъюгативные плазмиды способны передаваться в реципиентные клетки в присутствии определенных конъюгативных плазмид. Данное явление получило название мобилизации неконъюгативных плазмид. Известны два основных механизма мобилизации неконъюгативных плазмид. Во-первых, перенос неконъюгативных плазмид осуществляется за счет продуктов *tra*-генов конъюгативных плазмид. Такой перенос требует функционирования собственных генов *mob* и начинается с собственного сайта *oriT*. При этом механизме мобилизации перенос конъюгативной плазмиды в реципиентную клетку может и не происходить. По такому механизму происходит, например, мобилизация плазмид ColE1 и RSF1010. Во-вторых, перенос неконъюгативных плазмид в реципиентные клетки может осуществляться в составе коинтегратов с конъюгативными плазмидами. Коинтеграт представляет собой единую молекулу ДНК, объединяющую два или более репликонов. Образование коинтегратов в основном может происходить либо за счет реципрокной рекомбинации по участкам гомологии двух различных плазмид, либо за счет транспозиции IS-элементов и транспо-

зонов. По такому механизму, например, происходит мобилизация широко используемых векторных плазмид серии рВR.

Интеграция полового фактора в хромосому, приводящая к образованию Hfr-штаммов, также является примером формирования коинтегратов. В данном случае в единую молекулу ДНК объединены два репликона — плаزمиды (половой фактор) и хромосома.

Мобилизация неконъюгативных плазмид широко используется в практике генетических экспериментов. Этот метод менее трудоемок, чем трансформация и, кроме того, позволяет вводить неконъюгативные плазмиды в клетки микроорганизмов, для которых не разработаны системы трансформации.

Для мобилизации неконъюгативных плазмид можно использовать также трехродительские скрещивания, когда мобилизуемая и мобилизующая плазмиды находятся в разных донорных штаммах. Трехродительские скрещивания обладают рядом преимуществ по сравнению с двухродительскими. Прежде всего отпадает необходимость конструировать донорный штамм, содержащий две плазмиды. Кроме того, трехродительские скрещивания позволяют преодолеть барьер несовместимости, когда мобилизуемая и мобилизующая плазмиды относятся к одной группе несовместимости.

Постановка скрещивания. Существует несколько способов скрещивания бактериальных штаммов при помощи конъюгации: в жидкой среде, на поверхности питательного агара, на мембранных фильтрах. Выбор способа скрещивания определяется типом конъюгативной плазмиды и целью эксперимента. Самым простым способом является скрещивание в жидкой среде. В этих условиях с высокой эффективностью происходит скрещивание, обусловленное половым фактором F и родственными ему плазмидами. Однако этот метод имеет ограниченное применение, поскольку многие плазмиды детерминируют образование коротких пилей (например, плазмиды R-группы несовместимости), которые в условиях жидкой среды не обеспечивают тесного контакта между клетками. Для создания такого тесного контакта между клетками скрещивание проводят непосредственно в чашке с агаризованной питательной средой или на мембранном фильтре, помещенном на поверхность агаризованной питательной среды. Последний способ более удобен в случае, когда необходимо провести одновременно несколько скрещиваний. Для скрещивания используют мембранные фильтры, задерживающие микроорганизмы, т. е. с диаметром пор 0,45 или 0,22 мкм.

Детальное описание экспериментов, основанных на конъюгации, для генетического анализа у бактерий можно найти в ряде руководств (см. список литературы). В данном пособии мы приводим общую методику постановки конъюгации скрещиваний на примере мобилизации неконъюгативной плазмиды RSF1010 конъюгативной плазмидой RP1.

Родительские штаммы микроорганизмов, используемые в скрещивании, должны различаться между собой генетическими маркерами, например маркерами аутокотрофности или устойчивости к антибиотикам. В случае *E. coli* одним штаммом, например, может быть С600 (*thr leu thi*), а другим — J53 (*pro met*). Допустим, что один из штаммов С600 содержит конъюгативную плазмиду RP1 (кодирующую устойчивость к ампициллину, тетрациклину и канамицину), а второй штамм С600 содержит неконъюгативную плазмиду RSF1010 (кодирующую устойчивость к сульфаниламидам и стрептомицину), которую нужно передать в штамм J53.

Для скрещивания используют молодые, активно растущие культуры, причем концентрация реципиентных клеток должна значительно (примерно в 10 раз) превышать концентрацию донорных клеток. С этой целью ночные культуры всех трех штаммов *E. coli* (выращивать можно без аэрации) разводят примерно в 5 раз теплой средой LB и подрачивают в течение 90—100 мин. Затем в пробирке (удобно использовать пробирки Эппендорф) смешивают по 20 мкл донорных культур, т. е. штаммов с плазмидами RP1 и RSF 1010, и 0,1 мл культуры реципиента. Растирают смесь шпателем по поверхности среды LB-агар и чашку инкубируют при 37° в течение 3 ч. По окончании скрещивания клетки смывают шпателем с поверхности агара 2 мл физраствора и делают 10-кратное серийное разведение конъюгационной смеси в физрастворе до 10^{-5} . Затем пробы по 0,1 мл из разведений 10^{-3} и 10^{-5} высевают на чашки с селективными средами. Одна чашка должна содержать селективную среду с одним из антибиотиков для отбора трансконъюгантов, получивших плазмиду RP1 (канамицин — 50 мкг/мл, тетрациклин — 20 мкг/мл, тетрациклин — 20 мкг/мл, тетрациклин — 20 мкг/мл, ампициллин — 100 мкг/мл), другая — со стрептомицином (50 мкг/мл) для отбора трансконъюгантов, получивших плазмиду RSF1010. В качестве основы для селективной среды используют минимальную среду А (с добавками пролина и метионина), на которой могут расти только клетки штамма J53. В качестве контроля на селективные чашки засевают по 0,1 мл культур родительских штаммов, чтобы убедиться в неспособности клеток этих штаммов образовывать колонии на селективных средах. Засеянные чашки помещают в термостат при 37° на 48 ч. По окончании инкубации проводят подсчет трансконъюгантов в чашках с селективными средами. Частота мобилизации неконъюгативной плазмиды RSF1010 определяется как отношение количества трансконъюгантов, получивших маркер неконъюгативной плазмиды, к количеству трансконъюгантов, получивших маркер конъюгативной плазмиды.

СИСТЕМАТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

11.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ПРАВИЛА НАИМЕНОВАНИЯ

Описано несколько тысяч видов микроорганизмов, однако считают, что это составляет лишь около 5% от реально существующих. Изучение разнообразия микроорганизмов составляет предмет систематики. Основной ее задачей является создание естественной системы, отражающей филогенетические взаимоотношения микроорганизмов. До последнего времени систематика микроорганизмов базировалась преимущественно на фенотипических признаках: морфологических, физиологических, биохимических и других. Поэтому существующие системы классификации носят в значительной степени искусственный характер. Однако они позволяют сравнительно легко идентифицировать некоторые вновь выделенные штаммы микроорганизмов.

Систематика включает такие разделы, как классификация, номенклатура и идентификация. Классификация определяет порядок помещения индивидуумов, обладающих заданной степенью однородности, в определенные группы (таксоны). Номенклатура представляет собой свод правил наименования таксонов. Идентификация означает определение принадлежности изучаемого организма к тому или иному таксону.

Термин «таксономия» часто используют как синоним систематики, однако иногда под ним понимают раздел систематики, включающий теорию классификации, учение о системе таксономических категорий, границах и соподчинении таксонов.

Основной таксономической категорией в микробиологии, как и в других биологических науках, является вид. Вид — это совокупность особей, характеризующихся рядом общих морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических признаков.

Под термином «штамм» понимают чистую культуру микроорганизма, выделенную из определенного места обитания (воды, почвы, организма животного и т. д.). Разные штаммы одного вида микроорганизмов могут различаться по некоторым признакам, например, чувствительности к антибиотикам, способности синтезировать некоторые продукты метаболизма и т. д., но эти различия меньше чем видовые¹. Виды микроорганизмов объединяют в так-

¹ Понятия «штамм» в микробиологии и генетике несколько различаются: в микробиологии оно является более широким.

сономические категории более высокого порядка: роды, семейства, порядки, классы, отделы, царства. Эти категории называются обязательными. Предусмотрены также необязательные категории: подкласс, подпорядок, подсемейство, триба, подтриба, подрод, подвид. Однако в систематике необязательные категории используются довольно редко.

Номенклатура микроорганизмов подчиняется международным правилам. Так, имеется Международный кодекс номенклатуры бактерий. Для дрожжевых грибов основным руководством является «The Yeasts. A Taxonomic Study», для мицелиальных грибов и водорослей — Международный кодекс ботанической номенклатуры.

Для наименования объектов в микробиологии, как в зоологии и ботанике, используют бинарную или биномиальную (от лат. *bis* — дважды) систему номенклатуры, в соответствии с которой каждый вид имеет название, состоящее из двух латинских слов. Первое слово означает род, а второе — определяет конкретный вид этого рода и называется видовым эпитетом. Родовое название всегда пишется с заглавной буквы, а видовое — со строчной даже в том случае, если видовой эпитет присвоен в честь ученого, например *Clostridium pasteurianum*. В тексте с латинской графикой все словосочетание обычно выделяют курсивом. При повторном упоминании названия микроорганизма родовое название можно сократить до одной или нескольких начальных букв, например *C. pasteurianum*. Если в тексте встречаются названия двух микроорганизмов, которые начинаются с одной и той же буквы (например, *Clostridium pasteurianum* и *Citrobacter freundii*, то сокращения должны быть разными (*C. pasteurianum* и *Ct. freundii*). Если микроорганизм идентифицирован только до рода, вместо видового эпитета пишут слово *sp.* (*species* — вид), например *Pseudomonas sp.* В этом случае при повторном упоминании названия микроорганизма в тексте родовое название следует всегда писать полностью; *Pseudomonas sp.*

Для наименования подвида используют словосочетание, состоящее из названия рода, а также видового и подвидового эпитетов. Для разграничения этих эпитетов между ними пишут буквенное сочетание, представляющее собой сокращенное слово *subspecies* — «*subsp.*» или реже «*ss.*». Например, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Для каждого штамма указывают также аббревиатуру названия коллекции культур микроорганизмов, в которой он хранится, и номер, под которым он там значится. Например, *Clostridium butyricum* АТСС 19398 означает, что штамм хранится в американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, АТСС) под номером 19398. Список коллекций микроорганизмов, пользующихся мировой известностью, приводится в Руководстве Берги по систематике бактерий (Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology, 1984—1989), в Каталоге культур микроорганизмов (Пушино, 1992) и других справочных изданиях.

Описание любого нового вида микроорганизма базируется на типом штамме, который хранится в одной из коллекций микроорганизмов и на основании совокупности свойств которого характеризуется данный вид в оригинальной статье или определителе. Например, *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Типовой штамм является номенклатурным типом вида, поскольку за ним закреплено видовое название. Если какие-либо штаммы, первоначально включенные в тот же вид, в дальнейшем будут признаны заслуживающими выделения в особые виды, они должны получить новые названия, а старое видовое название сохраняется за типовым и родственными ему штаммами. При этом номер переименованного штамма сохраняется прежним. Для рода номенклатурным типом является специально обозначенный типовой вид, обладающий набором наиболее характерных для представителей данного таксона признаков. Например, в роде *Bacillus* типовым видом является *B. subtilis*.

В некоторых определителях и каталогах указывают старые названия переименованных микроорганизмов, а также приводят фамилии авторов, которые первыми выделили данный микроорганизм, и год первой публикации. Например, вид дрожжей, называемых в настоящее время *Candida magnoliae* (Lodder et Kreger-van Rij, 1952) Meyer et Yarrow 1978 ВКМ — 1685, впервые был выделен и описан Lodder и Kreger-van Rij в 1952 г. и назван *Torulopsis magnoliae*.

Кроме понятия «штамм» в микробиологии применяют термины «вариант», «тип», «форма». Они обычно используются для обозначения штаммов микроорганизмов, отличающихся по некоторым признакам от типового штамма. Штамм, отличающийся от типового по морфологическим особенностям, называют морфовар (морфотип), физиолого-биохимическим свойствам — биовар (биотип, физиологический тип), способности синтезировать определенные химические соединения — хемовар (хемоформа, хемотип), условиям культивирования — культивар, типответа на внедрение бактериофага — фаговар (фаготип, лизотип), антигенным характеристикам — серовар (серотип) и т. д.

В работах по генетике микроорганизмов часто используют термин «клон», под которым подразумевают популяцию генетически родственных клеток, полученную неполовым путем из одной родительской клетки. В молекулярной биологии клоном называют множественные копии идентичных последовательностей ДНК, полученные при их встраивании в клонирующие векторы (например, плазмиды). Под термином «генетически модифицированные», или «рекомбинантные», штаммы понимают штаммы микроорганизмов, полученные в результате генно-инженерных манипуляций. Часто новые штаммы микроорганизмов получают с помощью мутагенов.

Каждый новый штамм микроорганизмов, выделенный из при-

родных или техногенных источников, должен быть охарактеризован для получения полного набора данных о свойствах микроорганизма в чистой культуре. Эти данные могут быть использованы, например, для составления паспорта ценных в промышленном отношении штаммов, а также для их идентификации.

Цель идентификации — установить таксономическое положение исследуемого штамма на основании сравнения его свойств с изученными и принятыми (официально зарегистрированными) видами. Поэтому результатом идентификации обычно является отождествление исследуемого микроорганизма с каким-нибудь видом или отнесение к определенному роду. Если исследуемый штамм или группа штаммов отличаются по своим свойствам от представителей известных таксонов, то они могут быть выделены в новый таксон. Для этого дают описание нового таксона, включающее, например, в случае бактерий следующее: перечень штаммов, входящих в таксон; характеристику каждого штамма; перечень свойств, рассматриваемых в качестве существенных в таксоне; перечень свойств, которые квалифицируют таксон для представительства в ближайшем более высоком таксоне; перечень диагностических характеристик, дифференцирующих предлагаемый таксон от близко родственных таксонов; отдельное описание типового (для вида) штамма; фотографию микроорганизма.

Чтобы вновь предлагаемый таксон мог быть официально принят, его описание должно быть опубликовано в соответствии с определенными правилами. Например, действительное опубликование таксона бактерий предусматривает помещение статьи с его описанием в Международном журнале по систематике бактерий «International Journal of Systematic Bacteriology» (IJSB) или в другом журнале с последующим направлением отиска статьи с его описанием в IJSB. Культура типового штамма нового вида микроорганизмов передается на хранение в одну из коллекций микроорганизмов мирового значения. В случае утери типового штамма возможна его замена на так называемый неотиповой штамм. При этом должно быть подтверждено, что свойства нового штамма хорошо совпадают с описанием утерянного. Чтобы показать, что таксон предлагается впервые, после названия нового рода добавляется сокращенная комбинация «gen. nov.», а для нового вида — «sp. nov.». Например, в 1970 г. В. М. Горленко предложил новый род бактерий — *Prosthecochloris* gen. nov. и его вид *P. aestuarii* sp. nov. В дальнейшем при первичном использовании этих названий в публикации другими исследователями вместо указанных комбинаций ставится фамилия ученого, выделившего и описавшего микроорганизм, в данном случае *Prosthecochloris aestuarii* Gorlenko, 1970. Однако такая информация о виде дается не всегда, обычно приводится только его родовое название и видовой эпитет. Информацию об авторе, выделившем штамм, и дате первой публикации штамма при необходимости берут из определителей и каталогов.

Как уже отмечалось выше, принципы классификации и идентификации разных групп прокариот и эукариотных микроорганизмов имеют существенные различия. Идентификация грибов до классов, порядков и семейств основана на характерных чертах строения и способах образования в первую очередь половых структур. Кроме того, используется характеристика бесполоых спороношений, строение и степень развития мицелия (зачаточный, хорошо развитый, септированный или несептированный), культуральные (колония) и физиологические признаки. Дифференциация родов внутри семейств и идентификация видов проводятся с применением морфологических признаков, полученных с использованием электронной микроскопии, а также физиологических и культуральных особенностей. Единого определителя для идентификации всех грибов не существует, поэтому вначале определяют класс или порядок идентифицируемого гриба и далее пользуются соответствующим определителем для этого класса или порядка.

Идентификация дрожжевых грибов, которые относятся к числу широко используемых объектов разных микробиологических исследований, основана на культуральных (макрморфологических), цитологических, физиолого-биохимических особенностях, характеристике жизненных циклов и полового процесса, специфических признаках, связанных с экологией, и проводится с использованием специальных определителей для дрожжей.

В основе систематики микроскопических форм водорослей лежит строение их клеток и состав пигментов. Определение систематического положения простейших проводится с использованием морфологических особенностей и жизненных циклов. Таким образом, идентификация эукариот базируется главным образом на особенностях их морфологии и циклов развития.

Идентификация прокариот, которые морфологически менее разнообразны, чем эукариоты, основана на использовании широкого спектра фенотипических, а во многих случаях и генотипических признаков. Она в большей степени, чем идентификация эукариот, основывается на функциональных признаках, поскольку большинство бактерий можно идентифицировать не по их внешнему виду, а только выяснив, какие процессы они способны осуществлять.

При описании и идентификации бактерий изучают их культуральные свойства, морфологию, организацию клетки, физиолого-биохимические особенности, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК и другие фено- и генотипические признаки. При этом необходимо соблюдать следующие правила: работать с чистыми культурами, применять стандартные методы исследования, а также использовать для инокуляции клетки, находящиеся в активном физиологическом состоянии.

Культуральные свойства, т. е. характерные особенности роста бактерий на плотных и жидких питательных средах (см. гл. 9)

обычно используют для их характеристики, однако для идентификации применяют довольно редко.

Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий (см. гл. 6) включает такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Полезным может оказаться также выявление в клетках характерных мембранных систем и органелл (хлоросом, карбоксисом, фикобилисом, газовых вакуолей и т. д.), присущих отдельным группам бактерий, а также включений (параспоральных телец, гранул волютина, поли-β-гидроксиполитирата, полисахаридов и т. д.). Первостепенное значение для систематики бактерий придается окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок.

Физиолого-биохимические свойства включают прежде всего установление способа питания исследуемой бактерии (фото/хемо-, авто/гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входит также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого используют специальные тесты (см. гл. 9).

Многие тесты, применяемые для обнаружения перечисленных признаков (их иногда называют рутинными тестами), важны для диагностики и широко используются в медицинской микробиологии. Их постановка требует значительных затрат времени, большого количества сложных сред и реактивов, соблюдения стандартных условий проведения. Для ускорения и облегчения процесса идентификации некоторых микроорганизмов, имеющих главным образом медицинское значение, разработаны различные тест-системы: API-20E, Enterotube, Mucolube, Patho-Tec, СИБ, ПБДЭ и другие. Например, система Enterotube, предназначенная для идентификации энтеробактерий, представляет собой пластиковую камеру с 12 ячейками, содержащими окрашенные диагностические среды. Засев всех сред производится поступательно-вращательными движениями через камеру петли с посевным материалом. Инкубацию проводят в течение 24 ч при 37°. О положительном или отрицательном результате теста судят по изменению цвета среды, разрыву агара (тест на газообразование), или после введения специальных реактивов (тест на образование индола, реакция Вогес—Проскауэра). Каждый признак обозначают определенной цифрой, поэтому полученные данные можно ввести в компьютер с соответствующей программой и получить ответ о таксономическом положении исследуемого штамма.

При идентификации симбиотических и паразитических (патогенных) бактерий важно установить специфичность симбионта к хозяину, а также устойчивость к антимикробным веществам и фагам (фаготипирование).

Определение состава клеток бактерий также имеет значение для их систематики (хемотаксономия). Хемотаксономические методы могут быть важными, в частности, для тех групп бактерий, у которых морфологические и физиологические характеристики широко варьируются и недостаточны для проведения их удовлетворительной идентификации. В состав клеточных стенок разных прокариот входит несколько классов уникальных гетерополимеров: муреин (или псевдомуреин), липополисахариды, миколовые и тейхоевые кислоты. Состав клеточной стенки определяет и серологические свойства бактерий. Это лежит в основе иммунохимических методов их идентификации.

В качестве хемотаксономического маркера иногда используют также липидный и жирнокислотный состав клеток бактерий. Интенсивное изучение жирных кислот стало возможным с развитием метода газо-хроматографического анализа. Различия в составе липидов используют для идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Однако этот метод имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

В систематике некоторых бактерий учитывается состав хинонов и других переносчиков электронов, а также пигментов.

Важная информация о взаимном родстве бактерий может быть получена при изучении клеточных белков — продуктов трансляции генов. На основании изучения мембранных, рибосомных, суммарных клеточных белков, а также отдельных ферментов сформировалось новое направление — белковая таксономия. Спектры рибосомных белков относятся к числу наиболее стабильных и используются для идентификации бактерий на уровне семейства или порядка. Спектры мембранных белков могут отражать родовые, видовые и даже внутривидовые различия. Однако характеристики химических соединений клетки не могут использоваться для идентификации бактерий изолированно от других данных, описывающих фенотип, поскольку нет критерия оценки значимости фенотипических признаков.

Нередко при идентификации бактерий, а иногда и других микроорганизмов, например дрожжей, используют метод численной (или адансоновской) таксономии. В ее основе лежат идеи французского ботаника М. Адансона (M. Adanson), предложившего различные фенотипические признаки, поддающиеся учету, считать равноценными, что позволяет количественно выразить таксономические дистанции между организмами в виде отношения числа положительных признаков к общему числу изученных. Сходство между двумя исследуемыми организмами определяется путем количественной оценки возможно большего числа (обычно

не менее ста) фенотипических признаков, которые подбирают так, чтобы их варианты были альтернативными и могли обозначаться знаками «минус» или «плюс». Степень сходства устанавливается на основании количества совпадающих признаков и выражается в виде коэффициента сходства (S):

$$S = \frac{a+b}{a+b+c+d},$$

где a и d — суммы признаков, по которым штаммы А и В совпадают (a — оба штамма с положительными признаками; d — оба с отрицательными); b — сумма признаков, по которым штамм А положителен, а В — отрицателен; c — сумма признаков, по которым штамм А отрицателен, а штамм В положителен. Значение коэффициента сходства может меняться от 0 до 1. Коэффициент 1 означает полную идентичность, а 0 — полное несходство. Оценки комбинаций признаков производят с помощью компьютера. Полученные результаты представляют в виде матрицы сходства и/или в виде дендрограммы. Нумерическая таксономия может применяться при оценке сходства между таксонами микроорганизмов только невысокого ранга (роды, виды). Она не позволяет делать непосредственные выводы относительно генетического родства микроорганизмов, однако в известной степени отражает их филогенетические свойства. Так, установлено, что фенотипические признаки бактерий, поддающиеся изучению в настоящее время, отражают от 5 до 20% свойств их генотипа.

Изучение генотипа микроорганизмов стало возможным в результате успешного развития молекулярной биологии и привело к возникновению геносистематики. Исследование генотипа, основанное на анализе нуклеиновых кислот, в принципе дает возможность построить со временем естественную (филогенетическую) систему микроорганизмов. Филогенетические взаимоотношения бактерий оценивают определением содержания ГЦ в ДНК, ДНК—ДНК и ДНК—рРНК гибридизацией, с помощью ДНК-зондов, а также изучением последовательности нуклеотидов в 5S, 16S и 23S рРНК (см. гл. 8).

Молекулярное содержание ГЦ от общего количества оснований ДНК у прокариот, как уже указывалось, колеблется от 25 до 75%. Каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным средним содержанием ГЦ. Однако поскольку генетический код вырожден, а генетическое кодирование основано не только на содержании нуклеотидных оснований в единицах кодирования (триплеттах), но и на их взаимном расположении, то одинаковое среднее содержание ГЦ в ДНК двух видов бактерий может сопровождаться их значительным генотипическим разделением. Если два организма очень близки по нуклеотидному составу ДНК, то это может являться свидетельством их эволюционного родства только при условии, что они обладают большим числом общих фенотипических признаков или генетическим сходством, подтвержденным

другими методами. В то же время расхождение (более 10—15%) в нуклеотидном составе ДНК двух штаммов бактерий с общими фенотипическими свойствами показывает, что они относятся по крайней мере к разным видам.

Метод ДНК—ДНК гибридизации является более важным для оценки генетического родства бактерий. При тщательном проведении экспериментов можно получить ценную информацию о степени их генетической гомологии. Внутри одного вида бактерий степень генетической гомологии штаммов достигает 70—100%. Однако если в результате эволюционной дивергенции последовательности нуклеотидных оснований геномов двух бактерий различаются в большей степени, то специфическая реассоциация ДНК—ДНК становится такой слабой, что не поддается измерению. В таком случае гибридизация ДНК—рРНК позволяет значительно увеличить круг организмов, у которых можно определить степень генетической гомологии благодаря тому, что на относительно небольшом участке бактериального генома, кодирующем рибосомные РНК, исходная последовательность оснований сохраняется значительно полнее, чем на других участках хромосомы. В итоге методом ДНК—рРНК гибридизации часто обнаруживают довольно высокую гомологию геномов бактерий, у которых реассоциация ДНК—ДНК не выявляет заметной гомологии.

Для идентификации бактерий иногда используют также метод ДНК-зондов (генных зондов), являющийся разновидностью метода молекулярной гибридизации ДНК—ДНК. Реакция гибридизации ведется в этом случае не между двумя препаратами тотальной ДНК, а между фрагментом нуклеотидной последовательности ДНК (зондом), включающим ген (генетический маркер), ответственный за какую-то определенную функцию (например, устойчивость к какому-нибудь антибиотику), и ДНК изучаемой бактерии. Самым распространенным способом создания генных зондов является выделение специфических фрагментов путем молекулярного клонирования. Для этого вначале создают «банк генов» изучаемой бактерии расщеплением ее ДНК эндонуклеазами рестрикции, а затем отбирают нужный клон из суммы фрагментов ДНК методом электрофореза с последующей проверкой генетических свойств этих фрагментов методом трансформации. Далее выбранный фрагмент ДНК с помощью фермента лигазы вводят в состав подходящей плазмиды (вектора), а эту комбинированную плазмиду вводят в удобный для работы штамм бактерий (например, *Escherichia coli*). Из биомассы бактерии, несущей ДНК-зонд, выделяют плазмидную ДНК и метят ее, например, радиоизотопной меткой. Затем осуществляют гибридизацию ДНК зонда с ДНК бактерии. Образовавшиеся гибридные участки проявляют методом ауторадиографии. По относительной частоте гибридизации генетического маркера с хромосомой той или иной бактерии делают заключение о генетическом родстве этих бактерий с исследуемым штаммом.

Однако наиболее широкое распространение и значение для идентификации бактерий и создания филогенетической системы их классификации получил метод анализа нуклеотидных последовательностей в рибосомальных РНК. Молекулы 5S, 16S и 23S рРНК содержат участки с самой высокой степенью генетической стабильности. Считают, что они находятся вне механизма действия естественного отбора и эволюционируют только в результате спонтанных мутаций, происходящих с постоянной скоростью. Так как накопление мутаций зависит только от времени, то информация о нуклеотидной последовательности этих молекул является наиболее объективной для определения филогенетического родства организмов на уровне от подвида до царства. В случае анализа 5S рРНК обычно определяют полную последовательность нуклеотидных последовательностей, которая в этой молекуле у прокариот составляет 120 нуклеотидов. При исследовании 16S и 23S рРНК, содержащих 1500 и 2500 нуклеотидов соответственно, часто проводят анализ олигонуклеотидов, полученных из этих молекул с помощью специфических эндонуклеаз рестрикции. Наиболее широкое распространение получило изучение последовательности олигонуклеотидов в 16S рРНК. Изучение структуры 16S рРНК представителей разных бактерий привело к выявлению среди прокариот группы архебактерий. Значения коэффициента сходства S_{AB} , отделяющие 16S рРНК эубактерий и архебактерий, лежат в пределах 0,1, в то время как значение S_{AB} , равное 1,0, соответствует полной гомологии нуклеотидных последовательностей, а 0,02 — уровню случайного совпадения.

Все чаще для идентификации бактерий предлагают дендрограммы, показывающие взаимоотношения между бактериальными родами, видами или штаммами на основании изучения последовательности нуклеотидов (или олигонуклеотидов) в рРНК, а также ДНК—ДНК и ДНК—рРНК гибридизации. Однако различия в темпе эволюции у разных групп организмов, а также трудоемкость и дороговизна этих методов, не дают возможность использовать только филогенетический подход для систематики бактерий. Более того, идентификация бактерий до родов на основании только генетических методов без предварительного изучения их фенотипических характеристик часто вообще невозможна. Поэтому лучшим подходом в работе по систематике бактерий является изучение как генотипических, так и фенотипических свойств. В случае несоответствия между филогенетическими и фенотипическими данными приоритет временно отдают последним.

Идентификацию бактерий проводят обычно с помощью определителя Берги (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Первое издание этого пособия было осуществлено в 1923 г. под руководством известного американского бактериолога Д. Берги (D. H. Bergey, 1860—1937). С тех пор оно регулярно переиздается с участием ведущих ученых-микробиологов мира. В последнем, 9-м издании Определителя Берги (1993), все бактерии разделены

на 35 групп по легко определяемым фенотипическим признакам. Эти признаки вынесены в названия групп. Таксономическое положение бактерий внутри групп определяется с помощью таблиц и ключей, составленных на основе небольшого числа фенотипических признаков.

Более полная информация о таксономическом положении бактерий содержится в 4-томном Руководстве Берги по систематике бактерий (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984—1989). Для каждой группы бактерий дается описание входящих в него родов и видов, в том числе с неясным таксономическим статусом. Помимо подробного фенотипического описания, включающего морфологию, организацию и химический состав клеток, антигенные свойства, вид колоний, особенности жизненного цикла и экологии, в характеристике родов приводятся также сведения о содержании ГЦ в ДНК, результатах гибридизации ДНК—ДНК и ДНК—рРНК. Ключи и таблицы позволяют идентифицировать бактерии не только до рода, но и до вида.

Помимо определителя Берги имеется ряд статей и книг, в которых предлагаются оригинальные ключи для идентификации отдельных групп бактерий, например бацилл, псевдомонад, актиномицетов, энтеробактерий. Для иллюстрации приведем схему идентификации некоторых видов бацилл (табл. 14)¹.

Таблица 14

Ключ для определения бактерий рода *Bacillus*

1. Каталаза	— есть	2
	— нет	17
2. Реакция Вогес-Проскауэра	— положительная	3
	— отрицательная	10
3. Рост в анаэробном агаре	— есть	4
	— нет	9
4. Рост при 50°	— есть	5
	— нет	6
5. Рост в МГІБ с 7% NaCl	— есть <i>B. licheniformis</i>	
	— нет <i>B. coagulans</i>	
6. Кислота и газ на среде с глюкозой	— есть <i>B. polymyxa</i>	
	— нет	7
7. Восстановление NO ₃ ⁻ до NO ₂ ⁻	— есть	8
	— нет <i>B. alvei</i>	
8. Параспоральные тельца	— есть <i>B. thuringiensis</i>	
	— нет <i>B. cereus</i>	
9. Гидролиз крахмала	— есть <i>B. subtilis</i>	
	— нет <i>B. pumilus</i>	
10. Рост при 65°	— есть <i>B. stearothermophilus</i>	
	— нет	11
11. Гидролиз крахмала	— есть	12
	— нет	15
12. Кислота и газ на среде с глюкозой	— есть <i>B. macerans</i>	
	— нет	13

¹ Приводится по книге: Избранные задачи большого практикума по микробиологии. М., Изд-во Моск ун-та, 1985.

13. Ширина клеток 10 мкм и больше	— да	<i>B. megaterium</i>	14
	— нет		
14. рН в среде для образования ацетона меньше 6,0	— да	<i>B. circulans</i>	
	— нет	<i>B. firmus</i>	
15. Рост в анаэробном агаре	— есть	<i>B. laterosporus</i>	16
	— нет		
16. Кислота на среде с глюкозой	— есть	<i>B. brevis</i>	
	— нет	<i>B. sphaericus</i>	
17. Рост при 65°	— есть	<i>B. stearothermophilus</i>	18
	— нет		
18. Гидролиз казеина	— есть	<i>B. larvae</i>	19
	— нет		
19. Параспоральные гелльца	— есть	<i>B. popilliae</i>	
	— нет	<i>B. lentimorbus</i>	

Следует отметить, что для описания новых штаммов бактерий изучают, как правило, больше признаков, чем необходимо для их идентификации, так как ключи и таблицы включают не все признаки идентифицируемых бактерий, а только те, которые отличаются у разных видов (табл. 15).

Таблица 15

Минимальный перечень данных, необходимых для описания новых штаммов бактерий (по Truper, Schleifer, 1992)

Свойства	Основные признаки	Дополнительные признаки
Морфология клеток	форма, размер; подвижность; внутриклеточные и внеклеточные структуры; взаимное расположение клеток; клеточная дифференцировка; тип клеточного деления; ультраструктура клетки	цвет; характер жгутикования; споры капсулы, чехлы, выросты; жизненный цикл, гетероцисты, гормогонии; ультраструктура жгутиков, оболочки, клеточной стенки
Характер роста	особенности роста на плотных и в жидких питательных средах; морфология колоний.	цвет колоний, суспензии
Окраска	по Граму	на кислотоустойчивость, окраска спор, жгутиков
Состав клетки	состав ДНК; запасные вещества	гомология нуклеиновых кислот; клеточные пигменты; состав клеточной стенки; типичные ферменты

Свойства	Основные признаки	Дополнительные признаки
Физиология	отношение к температуре; к рН среды; тип метаболизма (фототроф, хемотроф, литотроф, органотроф); отношение к молекулярному кислороду; акцепторы электронов; источники углерода; источники азота; источники серы	потребность в солях или осмотических факторах; потребность в факторах роста; типичные продукты метаболизма (кислоты, пигменты, антибиотики, токсины); устойчивость к антибиотикам
Экология	условия обитания	патогенность, круг хозяев; образование антигенов; серология; восприимчивость к фагам; симбиоз

СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Среды, обеспечивающие рост различных хемоорганогетеротрофных бактерий

1. Мясо-пептонный бульон.
2. 4—8 °Б сусло.
3. Среда состава (г): пептон — 10,0; дрожжевой экстракт — 1,0; глюкоза — 1,0—4,0; вода дистиллированная — 1000 мл; pH — 6,8—7,0.
4. Крахмало-аммиачная среда (г): растворимый крахмал — 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0; NaCl — 1,0; CaCO_3 — 3,0; агар — 15; вода водопроводная — 1000 мл.
5. Среда Чапека (г): сахароза — 30,0 или глюкоза — 20,0; NaNO_3 — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; вода дистиллированная — 1000 мл.
6. Среда БСА (бульон—сусло—агар). Мясо-пептонный бульон смешивают с равным объемом 6 °Б сусла и добавляют 2 г/л агара.

Среды стерилизуют при 1,0 или 0,5 ати в зависимости от наличия в них витаминов или других термолабильных факторов. Сахара стерилизуют отдельно при 1,0 ати в виде концентрированных растворов (обычно 40%) и добавляют в среды при посеве.

Среды для сахаролитических клостридий

1. Картофельная среда с мелом (см. с. 50).
 2. Среда состава (г): глюкоза — 10,0; пептон — 10,0; K_2HPO_4 — 1,0; CaCO_3 — 3,0—5,0; вода водопроводная — 1000 мл.
- Мел стерилизуют отдельно и добавляют к стерильной среде.

Среды для молочнокислых бактерий

1. 8—10 °Б сусло с дробинкой. К стерильной среде добавляют в избытке стерильный мел.
2. Обезжиренное молоко (обрат). Часто его разбавляют водой в отношении 2:1.
3. Среда MRS состава (г): гидролизат казеина — 10,0; мясной экстракт — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; глюкоза — 20,0; ацетат натрия — 5,0; цитрат аммония (двузамещенный) — 2,0; твин-80 — 1,0; K_2HPO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; вода дистиллированная — 1000 мл.

Среда для сапрофитных коринебактерий

Состав (г): гидролизат казеина — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; глюкоза — 5,0; NaCl — 5,0; дистиллированная вода — 1000 мл; pH — 7,2—7,4.

Среды для пропионовокислых бактерий

Компоненты, г/л дистиллированной воды	I	II	III	IV
Глюкоза*	20,0	—	20,0	20,0
Лактат Na или Ca	—	10,0	—	—
Дрожжевой экстракт	4,9	10,0	—	—
Кукурузный экстракт	—	—	20,0	—
Гидролизат казеина	10,0	10,0	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0	—	3,0	3,0
KH ₂ PO ₄	—	2,5	—	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	—	—	0,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005	—	0,005	0,005
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,005	—	—	—
Биотин*	—	—	—	1,0 мкг
Пантотенат Ca	—	—	—	1000 мкг
Тиамин	—	—	—	200 мкг
pH	6,8—7,0	6,8—7,0	6,8—7,0	6,8—7,0

* Глюкозу и витамины стерилизуют отдельно и вносят в стерильную среду перед посевом.

При использовании глюкозы жирные кислоты, образуемые пропионовокислыми бактериями, необходимо ежедневно нейтрализовать стерильным раствором 10%-ного NaHCO₃.

Среда для сапрофитных микобактерий и нокардий

1. Овсяный агар (ISP — 3) (г): овсяная мука (или хлопья) — 20,0; агар — 3,0 г.

Среды для актиномицетов

1. Овсяный агар (ISP — 3) (г): овсяная мука (или хлопья) — 20,0; агар — 20,0—25,0; вода дистиллированная — 1000 мл; следы солей — FeSO₄ — 0,1; MnCl₂ — 0,1; ZnSO₄ — 0,1. Вместо дистиллированной воды и солей можно использовать водопроводную воду. Для приготовления среды овсяную муку (или хлопья) варят в 1 л воды 20 мин, фильтруют и доводят объем до 1 л. Среду применяют для хранения и определения культуральных, а также морфологических признаков.

2. Синтетические и полусинтетические среды для актиномицетов

Компоненты, г/л водопроводной воды	Красиль- никова № 1	№ 6	№ 71	Гаузе № 1	Вакс- мана
Глюкоза	20,0	—	—	—	—
Крахмал растворимый	—	10,0	15,0	20,0	—
Глицерин	—	—	—	—	3,0
Кукурузный экстракт	—	10,0	10,0	—	—
KNO ₃	1,0	—	—	1,0	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	3,0	4,0	—	—
K ₂ HPO ₄	0,5	—	2,0	0,5	1,0
NaNO ₃	—	—	—	—	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	—	—	0,5	0,5
KCl	—	—	—	—	0,5
NaCl	0,5	3,0	—	0,5	—
CaCO ₃	1,0	3,0	3,0	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	следы	—	—	следы	0,01
pH	7,0—7,2	7,0—7,2	6,6—7,2	7,2—7,4	7,0

Указанные среды используют как с агаром, так и без него. Среда с кукурузным экстрактом применяют для определения антибиотических свойств. Часто для этой цели используют также среду Гаузе № 2 состава (г): триптон — 2,5 или бульон Хоттингера — 30 мл; пептон — 5,0; NaCl — 5,0; глюкоза — 10,0; вода водопроводная — 1000 мл; pH — 7,0—7,4. Среду можно использовать и с агаром.

Среды для бактерий, использующих целлюлозу

1. Среда Хетчинсона и Клейтона для аэробных бактерий (г): целлюлоза — кусочки фильтровальной бумаги; NaNO_3 — 2,5; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; NaCl — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; вода дистиллированная — 1000 мл.

2. Среда Имшенецкого для анаэробных бактерий (г): фильтровальная бумага — 15,0; $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ — 1,5; K_2HPO_4 — 0,5; KH_2PO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4; NaCl — 0,1; пептон — 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — следы; FeSO_4 — следы; CaCO_3 — 2,0; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 7,0—7,4.

Среды для уксуснокислых бактерий

1. 4—6 °Б сусло — 100 мл; этанол (ректификат) — 4—5 мл

2. Среда состава (г): глюкоза — 100,0; дрожжевой экстракт — 10,0; CaCO_3 — 20,0; агар — 15,0; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 6,8.

3. Среда состава (г): дрожжевой экстракт — 5,0; пептон — 3,0; маннит — 25,0; агар — 15,0; вода дистиллированная — 1000 мл.

3-ю среду используют для культивирования бактерий рода *Gluconobacter*.

Среды для бактерий рода *Caulobacter*

1. Картофельный агар.

2. Среда Красильникова и Беляева состава (г): пептон — 1,0; дрожжевой автолизат — 1,0 мл; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; агар — 15,0; вода водопроводная — 1000 мл.

Среда Хирш и Конти для метилотрофов

Состав: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5 г; KH_2PO_4 — 1,36 г; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,13 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 10,0 мг; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 2,5 мг; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 5,0 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2,5 мг; гидроксид метиламина — 6,75 мг; агар — 18,0 г; вода дистиллированная — 1000 мл; pH — 7,2. Непосредственно в питательную среду добавляют 4 г/л метанола. В качестве источника азота вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ можно использовать KNO_3 или мочевину в концентрации 100 мМ.

Более простой средой является среда Мевнуса состава (г): NaNO_3 — 1,0; K_2HPO_4 — 1,0; NaCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; вода водопроводная — 1000 мл. К 20 мл стерильной среды добавляют несколько капель метанола или после посева колбы помещают в эксикатор, в который ставят открытую пробирку с метанолом.

Среды для азотфиксаторов

1. Среда Эшби для азотобактера и олигонитрофилов (г): сахароза или маннит — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; NaCl — 0,2; FeSO_4 — 0,1; CaCO_3 — 5,0; вода дистиллированная — 1000 мл. В среду рекомендуется вносить смесь микроэлементов — 1 мл/л. Раствор микроэлементов (по Федорову) (г): H_3BO_3 — 5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 5,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; KI и NaBr — по 0,5; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; вода дистиллированная — 1000 мл.

2. Среда Виноградского для анаэробных азотфиксаторов рода *Clostridium* (г): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $CaCO_3$ — 20,0; NaCl, $MnSO_4$, $FeSO_4$ — среды; вода дистиллированная — 1000 мл. В среду рекомендуется добавлять дрожжевой экстракт — 10 мг/л и раствор микроэлементов по Федорову (см. выше) — 1 мл/л.

3. Среда Федорова в модификации Калининской для выделения азотфиксаторов (г): глюкоза — 10,0—15,0; K_2HPO_4 — 1,74; KH_2PO_4 — 0,91; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,3; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; NaCl — 0,5; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 0,01; дрожжевой экстракт — 0,015; смесь микроэлементов по Федорову — 1 мл; вода дистиллированная — 1000 мл.

4. Бобовый агар для клубеньковых бактерий. Состав среды (г): бобовый отвар — 1000 мл; сахара — 2,0; KH_2PO_4 — 1,0; $MgSO_4 \cdot H_2O$ — 0,3; агар — 15; pH — 7,0—7,2.

Бобовый отвар готовят следующим образом: 50 г бобов (белой фасоли или гороха) заливают 1 л водопроводной воды и варят до набухания и расгрескивания жоры, но не до полного разваривания. Отвар фильтруют через вату или несколько слоев марли и доводят объем до 1 л.

5. Маннитно-дрожжевая среда для клубеньковых бактерий (г): маннит — 10,0; дрожжевой экстракт — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,1—0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 0,002; агар — 15,0; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 6,8—7,0.

Среда Траутвейна для *Thiobacillus denitrificans*

Состав (г): $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ — 2,0; NH_4Cl — 0,1; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; KNO_3 — 1,0; $NaHCO_3$ — 0,1; раствор микроэлементов по Дреусу — 5 мл; pH — 7,0.

Раствор микроэлементов по Дреусу (Dreus, 1976), мг: ЭДТА Na — 800; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 10; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 4; $CuSO_4$ — 1; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 3; $ZnCl_2$ — 2; LiCl — 0,5; $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,5; H_3BO_3 — 1; KBr — 2; KJ — 2; $BaCl_2$ — 0,5; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 6,0. На 1 л среды добавляют от 5 до 10 мл этого раствора.

Среда Сильвермана и Люндгрена 9К для *Thiobacillus ferrooxidans*

1-й раствор: в 700 мл дистиллированной воды растворяют (г): $(NH_4)_2SO_4$ — 3,0; K_2HPO_4 — 0,5; KCl — 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ — 0,01.

2-й раствор: в 300 мл дистиллированной воды растворяют 44,2 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и добавляют 1 мл 10 н. сериой кислоты. Растворы стерилизуют отдельно и смешивают перед посевом. pH среды 2,5.

Среда Казерера для водородокисляющих бактерий

Состав (г): NH_4Cl — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $NaHCO_3$ — 0,5; раствор микроэлементов по Дреусу — 10 мл; pH 7,0, вода дистиллированная — 1000 мл.

После посева колбы помещают в эксикатор, заполненный газовой смесью состава (%): CO_2 — 10; O_2 — 5—30; H_2 — 60—85; все газы для водород-

Среды для денитрифицирующих бактерий

Компоненты, г/л дистиллированной воды	Гильтея	Березовой
Цитрат К или Na (трехзамещенный)	5,0	20,0
KNO_3	2,0	1,0
Аспарагин	1,0	—
KH_2PO_4	2,0	1,0
K_2HPO_4	—	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0	2,0
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2	0,2
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	следы	следы
pH	6,8—7,2	6,8—7,2

ных бактерий взрывоопасны, поэтому при работе необходимо строго соблюдать правила техники безопасности!

Среды для сульфатвосстанавливающих бактерий

Компоненты, г/л дистиллированной воды	Баар	Постгейта В
Лактат Na	3,5 мл	3,5 мл
Дрожжевой экстракт	—	1,0
NH ₄ Cl	1,0	1,0
CaSO ₄ ·H ₂ O	1,0	1,0
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	2,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O*	—	0,5
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (соль Мора)	0,5	—
Раствор микроэлементов по Пфеннигу (состав см. с. 207)**	—	1 мл
1%-ный раствор Na ₂ S	5—8 мл	0,5 мл
в 1%-ном растворе NaHCO ₃ **		
pH	7,0—7,5	7,0—7,5

* Сернокислое железо растворяют в 1%-ной HCl, стерилизуют и добавляют в стерильную среду перед посевом.

** Стерилизуют отдельно и добавляют в стерильную среду перед посевом.

Среды для тионовых бактерий

Компоненты, г/л дистиллированной воды	Среда Ваксмана для <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Среда Старки для <i>Thiobacillus thioparus</i>
Сера (серный цвет)*	10,0 или	—
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O**	5,0	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	0,2
KH ₂ PO ₄	3,0	3,0
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	0,25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,01
Раствор микроэлементов по Дрексу	10 мл	10 мл
pH	4,0—5,0	7,5—8,0

* Селу стерилизуют текучим паром или спиртом 2 ч, затем спирт испаряют в сушильном шкафу при 50°.

** Стерилизуют отдельно и вносят в среду перед посевом.

Среды для выделения бактерий, окисляющих железо и марганец

1. Среда Лиске для железобактерий (г): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,5; K_2HPO_4 — 0,05; KCl — 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; вода дистиллированная — 1000 мл, pH 7,0.

Среду после стерилизации оставляют стоять 2—3 дня для насыщения кислородом и углекислотой, затем добавляют стерильную железную проволоку или свежесосажденное сернистое железо.

2. Среда Дубининой для *Metallogenium*: крахмал гидролизованный — 1 г; нормальная лошадиная сыворотка — 1 мл; ДНК — 10 мкг; свежесосажденный MnCO_3 — избыток; вода дистиллированная — 1000 мл.

Среды для фототрофных бактерий

1. Среда для зеленых и пурпурных серобактерий (г): NH_4Cl — 1,0; NaHCO_3 — 2,0—5,0; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl добавляют к средам для морских штаммов; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ¹ — 1,0; витамин B_{12} ¹ — 1 мкг; раствор микроэлементов (по Пфеннигу) — 1 мл; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 7,0—8,0.

Раствор микроэлементов по Пфеннигу (Pfennig, 1965), мг: ЭДТА — 500; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 200; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 10; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 3; H_3BO_3 — 30; $\text{CoCl}_2 \cdot \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 20; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 1; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 3; вода дистиллированная — 1000 мл. На 1 л среды добавляют от 1 до 10 мл.

2. Среда для пурпурных несерных бактерий (г): NH_4Cl — 0,4; дрожжевой экстракт — 0,2; соединение углерода — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; NaCl — 0,4; витамином B_{12} (1 мг/100 мл)¹ — 1 мл; цитрат Fe (0,1 г/100 мл)¹ — 5 мл; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; KH_2PO_4 — 0,5; NaHCO_3 ¹ — 2,0; раствор микроэлементов (по Пфеннигу)¹ — 1 мл, вода дистиллированная — 1000 мл; pH 6,8—7,3.

3. Среда Кратца и Мейерса для цианобактерий (г): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; KNO_3 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; K_2HPO_4 — 1,0; Na_2CO_3 — 1,5; FeNH_4 цитрат — 1,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; раствор микроэлементов — 1 мл; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 6,8—7,0.

Состав раствора микроэлементов (г): H_3BO_3 — 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,079; вода дистиллированная — 1000 мл.

Среды для дрожжей

1. 6—8 °Б сусло.

2. Глюкозо-пептонная среда (среда Сабуро) состава (г): глюкоза — 40; пептон — 10; агар — 20; вода водопроводная — 1000 мл.

3. Глюкозо-аммонийная среда состава (г): глюкоза — 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5,0; KH_2PO_4 — 0,85; K_2HPO_4 — 0,15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; NaCl — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; вода дистиллированная — 1000 мл.

¹ Стерилизуют отдельно и вносят в среду перед посевом.

Среды Виноградского для нитрификаторов

Компоненты, г/л водопроводной воды*	I фаза	II фаза
	нитрификации	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0	—
NaN_2C_2	—	1,0
K_2HPO_4	1,0	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,5
NaCl	2,0	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,4
CaCO_3	5,0	—
Na_2CO_3	—	1,0

* К средам рекомендуется добавлять раствор микроэлементов по Пфеннигу (см. с. 207) — 1 мл на 1 л среды.

К двум последним средам для обогащения их факторами роста добавляют иногда дрожжевой или мясной экстракты в количестве 2—5 г на 1 л среды.

Среды для мицелиальных грибов

- 3—4 °В сусло.
- Пептонио-декстрозный агар Ваксмана состава (г): глюкоза — 10,0; пептон — 5,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; вода водопроводная — 1000 мл.
- Среда Чапека—Докса состава (г): сахароза — 30,0; —3,0; K_2HPO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; KCl — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; агар — 15,0; вода дистиллированная — 1000 мл.
- Среда Ван-Итерсона для грибов, использующих целлюлозу. Двойной кружок фильтровальной бумаги сворачивают в виде фильтра и ставят острием вверх в колбу Эрленмейера на 100 мл с 50 мл водопроводной воды, содержащей 0,75 г/л K_2HPO_4 и 0,1 г/л MgSO_4 . Стерилизуют при 1,0 ати; pH до стерилизации устанавливают 7,0—7,4.

Среда Сегала для выделения галофилов

Жидкая среда (г/л): казаминовые кислоты — 7,5; дрожжевой автолизат — 10,0; 3-замещенный цитрат натрия — 3,0; KCl — 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 20,0; FeCl_3 — 0,023; NaCl — 250,0; вода дистиллированная — 1000 мл. Компоненты среды последовательно растворяют в 800 мл воды, доводят pH до 7,5—7,8 с помощью 1 М КОН, затем смесь автоклавируют при 1 ати 5 мин, среду охлаждают и фильтруют от осадка. Доводят pH до 7,4 с помощью 1 М HCl, а объем до 1000 мл и стерилизуют автоклавированием при 0,5 ати.

Если необходима твердая среда, то в жидкой среде после первого автоклавирования и доведения pH добавляют 20 г/л агара, нагревают до его расплавления, а затем автоклавируют. Среду разливают в чашки Петри при 60—70°, чтобы предотвратить преждевременное затверждение.

Среды для генетических экспериментов с *E. coli*

Минимальная среда А (г/л): K_2HPO_4 —10,5; KH_2PO_4 — 4,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; После автоклавирования добавляют 1 мл 1 М раствора $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 10 мл 20%-ного раствора глюкозы. Аминокислоты добавляют до конечной концентрации 40 мкг/мл (в случае D, L-формы) и 20 мкг/мл (в случае L-формы). Витамины добавляют до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Богатая среда LB (г/л): триптон — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; NaCl — 5,0.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ДОПУСТИМЫЕ СРОКИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ ПОСЕВОВ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы	Питательная среда	Температура хранения, °С	Число пересевов в год
1	2	3	4
<i>Acetobacter aceti</i>	6° Б сусло + 6% этанола	18—20*	12
<i>A. xylinum</i>			
<i>Azotobacter agile</i>	агаризованная среда Эшби	18—20*	6
<i>A. chroococcum</i>			
<i>A. vinelandii</i>			

* Средняя комнатная температура.

1	2	3	4
<i>Bacillus cereus</i> <i>B. mesentericus</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. subtilis</i>	картофельный агар	18—20*	4
<i>Caulobacter</i> sp.	агаризованная среда с дрожжевым автолизатом	4—6	2—3
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i>	МПА МПА МПБ+0,2% агара	18—20 18—20 18—20	6 12 6—8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. casei</i>	снятое молоко	18—20	18—20
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>L. pentoaceticum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	8—10 °Б сусло+ +дробина+мел 8—10 °Б сусло+ +дробина+мел	18—20 18—20	18—20 18—20
<i>Micrococcus luteus</i> <i>M. lysodeikticus</i>	МПА	18—20	6
<i>Mycobacterium flavum</i> <i>M. mucosum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>Nocardia</i> sp.	МПА+3 °Б сусло (1:1) та же	18—20 4—6 18—20	3—4 2—3 3—4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>	МПА	18—20	6—8
<i>Propionibacterium shermanii</i>	среды с кукуруз- ным экстрактом или лактатом	4—6	4—5
<i>Proteus vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i>	МПА	18—20	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	МПА	18—20	6

1	2	3	4
<i>Streptomyces griseus</i>	агаризованная среда		
<i>S. spheroides</i>	Чалека	18—20	4
<i>S. violaceus</i>	овсяный агар та же		
<i>Saccharomyces cerevisiac</i>	4—5 °Б сусло — агар	18—20	4—5
<i>Candida guilliermondii</i>	та же	18—20	6
<i>C. utilis</i>			
<i>Rhodotorula glutinis</i>	»	18—20	6
<i>R. rubra</i>			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	»	18—20	4—5
<i>Endomyces magnusii</i>	»	18—20	4—5
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	»	18—20	4—5

* Средняя комнатная температура

РЕЦЕПТЫ КРАСИТЕЛЕЙ, ИНДИКАТОРОВ И РАСТВОРОВ

Фуксин основной, насыщенный спиртовой раствор

Фуксин основной — 10 г; этанол — 96°-ный — 100 мл.

Фуксин основной карболовый (фуксин Циля)

5%-ный водный раствор свежеприготовленного фенола — 100 мл; насыщенный спиртовой раствор фуксина основного — 10 мл. Приготовленную смесь через 48 ч отфильтровывают. Краситель отличается устойчивостью.

Фуксин основной, водный раствор

Карболовый фуксин Циля — 1 мл; вода дистиллированная — 9 мл. Водный фуксин готовят непосредственно перед употреблением, так как он нестойк.

Метиленовый синий, насыщенный раствор

Метиленовый синий — 3 г; 90-ный этанол — 100 мл. Раствор оставляют на 2—3 дня, несколько раз перемешивают (взбалтывают), затем фильтруют. Раствор устойчив.

Метиленовый синий 1:40

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего — 1 мл; вода дистиллированная — 40 мл.

Метиленовый синий (по Леффлеру)

Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего — 30 мл; вода дистиллированная — 100 мл; КОН, 1%-ный водный раствор — 1 мл.

Генциановый фиолетовый карболовый

Раствор 1. Генциановый фиолетовый — 1 г; этанол 96°-ный — 10 мл.

Раствор 2. 5%-ный водный раствор свежеприготовленного фенола — 100 мл. После полного растворения генцианового фиолетового растворяют.

Кристаллический фиолетовый, водный раствор

Кристаллический фиолетовый — 20 мг; вода дистиллированная — 100 мл.

Эритрозин карболовый

Эритрозин — 3 г; вода дистиллированная — 100 мл; фенол свежеперегнанный — 5 г. После растворения эритрозина и фенола смеси дают отстояться.

Сафранин, водный раствор

2,5%-ный раствор сафранина в 96°-иом этаноле — 10 мл; вода дистиллированная — 100 мл.

Реактивы для окраски жгутиков

Протрава. 12 г танина растворяют при нагревании в 48 мл дистиллированной воды, к раствору прибавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса ($FeSO_4$) и 6 мл насыщенного спиртового раствора фуксин. Раствор отфильтровывают и сохраняют в банке с притертой пробкой. Протрава бывает готовой к употреблению через несколько дней после приготовления и может храниться в течение нескольких месяцев.

Краситель. Карболовый фуксин Циля и вода дистиллированная в соотношении 1:1.

Протраву и карболовый фуксин Циля готовят заранее. Разбавленный фуксин следует готовить незадолго до употребления. Непосредственно перед работой протраву и разбавленный фуксин необходимо отфильтровать через складчатый бумажный фильтр, так как осадки красок, легко образующиеся на стенке при наличии даже небольших количеств белка, будут сильно мешать окрашиванию и рассмотрению объекта.

Реактивы для окраски жгутиков по методу Фойтана

Протрава: танин — 5 г; фенол кристаллический — 1 г; вода дистиллированная — 100 мл.

Реактивы для серебрения: серебро азотнокислое — 5 г; вода дистиллированная — 100 мл.

Раствор серебра следует готовить без фильтрования и хранить в темной склянке. К 3—4 мл 5%-ного раствора азотнокислого серебра по каплям прибавляют раствор аммиака до помутнения и образования осадка, а затем осторожно — до растворения осадка. После этого вновь прибавляют раствор серебра до появления легкой опалесценции. Полученный раствор аммиачного серебра разводят дистиллированной водой в 10 раз.

Анилиновый черный

Анилиновый черный — 1,5 г; этанол 96°-ный — 50 мл; уксусная кислота 80%-ная — 10 мл; вода дистиллированная — 40 мл. После растворения краску фильтруют и через 3 дня она готова к употреблению.

Красители для выявления липидов

1. Судан III — 0,5 г; молочная кислота концентрированная — 100 мл.

2. Судан черный В — 0,3 г; этиловый спирт 70°-ный горячий — 100 мл. Раствор выдерживают в течение нескольких часов при 60° в закупоренной склянке, затем охлаждают и фильтруют.

Малахитовый зеленый, водный раствор

Малахитовый зеленый — 7,5 г; вода дистиллированная — 100 мл.

Раствор Люголя в модификации Грама

Йод кристаллический — 1 г; калий йодистый — 2 г; вода дистиллированная — 300 мл.

В ступку емкостью 30—50 мл помещают навеску йода и йодистого калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды и, продолжая растирать кристаллы, добавляют еще 5 мл воды. Йод растворяется в йодис-

том калии. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Срок годности раствора не более 30 дней; хранят его в темной посуде,

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы

Иод кристаллический — 1 г; калий йодистый — 3 г; вода дистиллированная — 300 мл. Раствор готовят так же, как предыдущий.

Приготовление тушь для негативного контрастирования

Тушь черная — 10 мл; вода дистиллированная — 30 мл.

Разведенную тушь центрифугируют, надосадочный слой разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 ати. Сохранить тушь можно также добавляя к ней раствор тиммерсола (1:1 000) в соотношении 1:2 и твин-80 (1:100) — 1 капля на 100 мл раствора.

Бумага, пропитанная раствором уксуснокислого свинца

Нарезают полоски фильтровальной бумаги, погружают их на 5—10 мин в 5%-ный водный раствор уксуснокислого свинца, высушивают на воздухе и стерилизуют в чашке Петри автоклавированием при 0,5 ати.

Реактив Фолина для определения белка по Лоури

В колбу объемом 1500 мл вносят 700 мл дистиллированной воды, 100 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г молибденовокислого натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 мл 85%-ной H_3PO_4 и 100 мл конц. HCl . Полученную смесь кипятят на слабом огне в течение 10 ч с обратным водяным холодильником. К охлажденной смеси добавляют 150 г сернокислого лития, (Li_2SO_4), 50 мл дистиллированной воды и 15 капель брома. Избыток брома удаляют кипячением в течение 15 мин без холодильника. Раствор охлаждают. Он должен быть желтым. Если раствор зеленый, добавляют еще несколько капель брома и вновь выпаривают избыток последнего. Объем раствора доводят до 1000 мл и хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой. Основной раствор обычно бывает 2н. Белок определяют с помощью 1н. раствора Фолина. Для этого титрованием 0,1н. NaOH с фенолфталеном определяют концентрацию основного раствора и разбавляют его дистиллированной водой до 1н.

Реактив Эрлиха

Para-диметиламинобензальдегид — 1 г; 96°-ный этанол — 95 мл. HCl концентрированная — 20 мл.

Реактив Эрлиха в модификации Ковача

Para-диметиламинобензальдегид — 1 г; амиловый или изоамиловый спирт — 15 мл; HCl концентрированная — 10 мл.

Реактив Несслера

KI — 70 г; HgI_2 — 100 г; KOH — 100 г.

Раствор 1. Навески KI и HgI_2 растворяют в 400 мл дистиллированной воды.

Раствор 2. Навеску KOH растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Растворы 1 и 2 смешивают и доводят общий объем до 1 л. В случае образования осадка верхний прозрачный слой декантируют. Раствор хранят в темной стеклянной посуде. В продаже имеется готовый реактив Несслера.

Реактив Грисса

Раствор 1. 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты. Добавляют 100 мл дистиллированной воды и фильтруют. Раствор сульфаниловой кислоты устойчив в течение месяца.

Раствор 2. 0,1 г α -нафтиламина растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды. Охлаждают и добавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор α -нафтиламина фильтруют и хранят не более недели. Непосредственно перед использованием смешивают равные объемы этих растворов.

Реактивы для крахмало-йодной пробы на нитриты

1. Крахмал — 0,4 г; $ZnCl_2$ — 2,0 г; H_2O — 100 мл.

$ZnCl_2$ растворяют в 10 мл воды, кипятят и добавляют крахмал. Доводят объем до 100 мл и оставляют стоять неделю. Затем раствор фильтруют и добавляют равный объем 0,2%-ного раствора KI .

2. Раствор соляной кислоты: концентрированная HCl — 10 мл; вода — 84 мл.

Фиксирующие жидкости

1. 96°-ный этиловый спирт; время фиксации — 10—15 мин.

2. Метиловый спирт, безводный; время фиксации — 3—5 мин.

3. Смесь Никифорова; этиловый спирт и серный эфир в равных объемах, время фиксации — 5—10 мин.

4. Спиртформол — 40%-ный формалин — 5 мл; 96°-ный этиловый спирт — 95 мл; время фиксации — 5—15 мин.

5. 1—2%-ный водный раствор осмиевой кислоты; фиксация в парах 3—5 мин. Раствор осмиевой кислоты хранят в темном флаконе с притертой пробкой. При работе соблюдать осторожность, так как пары осмия могут повредить глаза.

6. 40%-ный формалин, фиксация в парах — несколько секунд.

7. Фиксатор Карнуа: 96°-ный спирт — 60 мл, хлороформ — 30 мл, ледяная уксусная кислоты — 10 мл; время фиксации — 15 мин.

8. Жидкость Руге: 40%-ный формалин — 20 мл, ледяная уксусная кислота — 1 мл, вода дистиллированная — 1000 мл; время фиксации — 5 мин. Рекомендуется для фиксации клеток, выращенных в жидких средах неопределенного состава.

9. Фосфорномолибденовая кислота, 5%-ный водный раствор; время фиксации — 5 мин.

Черинла по стеклу

Раствор 1. 1 г фуксина основного растирают в ступке с 15 мл этилового спирта.

Раствор 2. К 2 г таннина добавляют 15 мл воды и нагревают до кипения.

Растворы 1 и 2 смешивают в равных объемах.

Перегонка фенола

Фенол перегоняют из колбы Вюрца, закрытой корковой пробкой. Колбу помещают непосредственно на сетку. В качестве приемника используют заранее взвешенную сухую фарфоровую чашку. В нее отгоняют некоторое количество фенола, и когда он застывает, определяют его массу, исходя из которой готовят соответствующий объем раствора или необходимого реактива. Перегонку фенола осуществляют в вытяжном шкафу. При работе с фенолом следует соблюдать большую осторожность, так как он вызывает сильные ожоги.

Важнейшие кислотно-основные индикаторы (по Лурье, 1967)

Индикатор	Концентрация, %	Растворитель	Интервал перехода рН	Окраска индикатора
1	2	3	4	5
Метилловый фиолетовый (метилвиолет, 1-й переход)	0,1 и 0,05	вода	0,1—0,5	желтая — зеленая
Метилловый зеленый	0,05	вода	0,1—2,0	желтая — зелено-голубая
Метилловый фиолетовый (2-й переход)	0,1	вода	1,0—1,5	зеленая — синяя
m-Крезоловый пурпурный (1-й переход)	0,04	20°-ный раствор	1,2—2,8	красная — желтая
Тимоловый синий (тимолблау, 1-й переход)	0,1	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	1,2—2,8	красная — желтая
Метилловый фиолетовый (3-й переход)	0,1	вода	2,0—3,0	синяя — фиолетовая
Метилловый оранжевый (метилоранж, оранжев. III, геллантин)	0,1	вода	3,1—4,4	красная — оранжево-желтая
Бромфеноловый синий (бромфенолблау)	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	3,0—4,5	желтая — синяя
Конго-красный (конгорот)	0,1 и 1,0	вода	3,0—5,2	сине-фиолетовая — красная
Бромкрезоловый синий (бромкрезолгрюн, бромкрезолблау, бромкрезоловый зеленый)	0,1	а) 20°-ный спирт, б) вода с добавлением 2,9 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	3,8—5,4	желтая — синяя
Метилловый красный (метилрот)	0,1 и 0,02	60°-ный спирт	4,2—6,4	красная — желтая
Бромфеноловый красный (бромфенолрот, дибромфенолсульфоталеин)	0,1 и 0,04	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 3,9 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	5,0—6,8	желтая — красная

1	2	3	4	5
Бромкрезоловый пурпурный (бромкрезолпурпур, дибром- <i>о</i> -крезол-сульфофталеин)	0,1	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 3,7 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	5,2—6,8	желтая — пурпурная
Бромтимоловый синий (бромтимолблау, дибромтимолсульфофталеин)	0,05 0,1	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 3,2 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	6,0—7,6	желтая — синяя
Нейтральный красный (нейтральрот)	0,1	60°-ный спирт	6,8—8,4	красная — янтарно- желтая
Феноловый красный (фенолрот; фенолсульфофталеин)	0,1 и 0,05	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 5,7 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	6,8—8,4	желтая — красная
Крезоловый красный (крезолрот; <i>о</i> -крезол-сульфофталеин)	0,1	а) 50°-ный спирт б) вода с добавлением 5,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	7,2—8,8	янтарно- желтый пурпурно- красная
<i>м</i> -Крезоловый пурпурный (2-й переход)	0,04	20°-ный спирт	7,4—9,0	желтая — пурпурная
Тимоловый синий (2-й переход)	0,1 —	а) 20°-ный спирт б) вода с добавлением 4,3 мл 0,05 н. NaOH на 100 мг индикатора	8,0—9,6	желтая — синяя
Фенолфталеин	0,1 и 1,0	60°-ный спирт	8,2—10,0	бесцветная — пурпурная
Тимолфталеин	0,1 и 0,04	90°-ный спирт	9,3—10,5	бесцветная — синяя
Оранжевый ж	0,1	вода	11,5—14,0	желтая — красная

Примечание. Вода дистиллированная.

Буферные растворы для приготовления и разведения суспензий микроорганизмов. Схема приготовления буферных растворов

Буферный раствор	Компонент А	Компонент Б
Фосфатный	0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17,8 г/л	0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15,6 г/л
Трис-НСl	0,1 М HCl 8,5 мл 36%-ной HCl+ 991,5 мл H_2O	0,1 М трис (оксиметилламинометан) 12,1 г/л
рН	Количество компонента А, мл	
	фосфатный буфер	трис-НСl буфер
6,0	61,5	—
6,2	92,5	—
6,4	132,5	—
6,6	187,5	—
6,8	245,0	—
7,0	305,0	—
7,2	360,0	221,0
7,4	405,0	207,0
7,6	435,0	192,0
7,8	457,5	162,5
8,0	473,5	134,0
Количество компонента Б, мл	500—А	500
Довести до объема дистиллированной водой	1 л	1 л

Физические свойства некоторых буферных растворов

Наименование	$pK_\alpha(20^\circ\text{C})$	$\Delta pK_\alpha/^\circ\text{C}$	Молярная масса	Молярность насыщенного раствора при 0°C
MES	6,15	—0,011	195,23	0,65
ADA	6,60	—0,011	212,15	—
BIS—TRIS PROPANE	6,80	—0,016	282,35	2,30
PIPES	6,80	—0,009	342,26	1,40
ACES	6,90	—0,020	182,20	0,22
MOPS	7,20	—0,006	209,26	3,00
TES	7,50	—0,200	229,25	2,60
HEPES	7,55	—0,014	238,31	2,30
HEPPS	8,00	—0,007	252,33	2,50
TRICINE	8,15	—0,021	179,18	0,80
TRIS	8,30	—0,310	121,13	2,40
BICINE	8,35	—0,018	163,17	1,10
Глицил-глициновый	8,40	—0,028	132,13	1,10
CHES	9,50	—0,009	207,30	0,85
CAPS	10,40	—0,009	221,32	0,85

Физиологический раствор

Готовят 0,85%-ный раствор NaCl в дистиллированной воде. При необходимости стерилизуют 30 мин при 1 атм.

Подготовка предметных и покровных стекол для приготовления препаратов

Предметные и покровные стекла считаются чистыми, когда капля воды растекается по их поверхности. Новые стекла обычно кипятят в 1%-ном растворе соды, промывают дистиллированной водой, слабым раствором соляной кислоты и затем опять дистиллированной водой. Стекла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем не менее суток выдерживают в растворе хромовой смеси. От бихромата стекла отмывают дистиллированной водой. Чистые стекла хранят в 96°-ном этаноле.

Обработка предметных стекол по Цеттнову

1. Стекла кипятят 10 мин в следующем растворе: бихромата калия — 20 г; дистиллированной воды — 200 мл; концентрированной серной кислоты — 20 мл.
2. Промывают в течение 5 мин слабым раствором едкого натра.
3. Тщательно промывают водой.
4. Промывают спиртом.

При отсутствии заранее приготовленных обезжиренных стекол можно быстро подготовить стекла, натирая их в сухом виде хозяйственным мылом и очищая затем чистой хлопчатобумажной тканью.

Средства для мытья посуды

Хромовые смеси. 1. В концентрированную серную кислоту добавляют около 5% (от объема серной кислоты) размельченного в порошок кристаллического двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$) и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения.

2. Двуххромовокислый калий растворяют в воде, затем в раствор осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят из расчета: вода — 100 мл; двуххромовокислый калий — 6 г; серная кислота (плотность 1,84) — 100 мл.

После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая смесь не обладает мощными свойствами. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную парафином, керосином, минеральными маслами и другими продуктами перегонки нефти.

Хромовая смесь сильно разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому работать с ней следует осторожно. Если она попала на руки или одежду, то пораженное место немедленно обмывают большим количеством воды, затем разбавленным раствором аммиака или соды, а затем снова водой.

Спиртовой раствор КОН — также хорошее моющее средство. Его готовят растворением 40—50 г КОН в 500 мл воды. После остывания раствора к нему добавляют спирт-сырец в таком количестве, чтобы общий объем составил 1 л.

- Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1987.
- Бабьева И. П., Агре Н. С. Практическое руководство по биологии почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1971.
- Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М.: Пищевая пром-ть, 1979.
- Блохина И. Н., Леванова Г. Ф., Антонов А. С. Систематика бактерий (с основами геносистематики). Н. Новгород, 1992.
- Водоросли. Справочник/ Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Маслюк Н. Б.: Киев, 1989.
- Глазер В. М., Зннченко В. В., Каменева С. В. Большой практикум по генетике микроорганизмов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.
- Громов Б. В. Строение бактерий. Л., 1985.
- Громов Б. В., Павленко Г. В. Экология бактерий: Л., 1989.
- Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология: М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992.
- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994.
- Зубжицкий Ю. Н. Метод люминесцентной микроскопии. Л.: Медицина, 1964.
- Каталог культур микроорганизмов. Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Всероссийская коллекция микроорганизмов. Пушкино-иа-Оке: Наука, 1992.
- Кожевин П. А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984.
- Краткий определитель бактерий Берги. М.: Мир, 1980.
- Кузнецов С. И., Дубинина Г. А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989.
- Курс низших растений/Под ред. М. В. Горленко. М.: Высшая школа, 1981.
- Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987.
- Мазин А. В. Методы современной генетики и геной инженерии. Новосибирск, 1990.
- Максимов В. Н. Многофакторный эксперимент в биологии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980.
- Международный кодекс ботанической номенклатуры/Под ред. Ф. А. Стафле и др. Л.: Наука, 1980.
- Международный кодекс номенклатуры бактерий. М.: Мир, 1980.
- Методы общей микробиологии/Под ред. Ф. Герхардта. М.: Мир, 1983. Т. 1—3.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д. Г. Звягинцева М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
- Практикум по микробиологии /Под ред. Н. С. Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.
- Промышленная микробиология/Под ред. Н. С. Егорова. М.: Высшая школа, 1989.
- Световая микроскопия в биологии. Методы/Под ред. А. Лейси. М.: Мир, 1982.
- Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. М.: Агропромиздат, 1990.
- Стейниер Р., Эдельберг Э., Игрэм Дж. Мир микробов: М.: Мир, 1979. Т. 1—3.
- Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. М.: Мир, 1976.

Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева К. И.: Практикум по микробиологии: М.: Колос, 1994.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975.

Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1986.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed/Eds J. G. Holt et al. Baltimore, 1993.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1—4. 8th ed. Baltimore, 1984, 1986, 1989.

Stanier R. Y., Ingraham J. L., Whaelis M: L., Painter P: R: The Microbial World. 5 ed. Prentice — Hall, Englewood Cliffs, 1986.

The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. 2nd Ed/ Eds A. Balows et al. Berlin: Heidelberg; New York: Springer—Verlag, 1992. Vol. 1—4.

The Yeasts. A taxonomic Study. Amsterdam, 1984.

Из предисловия к первому изданию	3
Из предисловия к третьему изданию	3
Глава 1. Общая характеристика микроорганизмов	5
1.1. Прокариоты	6
1.2. Эукариоты	13
1.3. Влияние физических и химических факторов на рост микроорганизмов	18
1.4. Обмен веществ	19
1.5. Микроорганизмы в природе и биотехнологии	20
Глава 2. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.....	22
2.1. Подготовка микробиологической лаборатории к работе	23
2.2. Правила работы с культурами микроорганизмов	24
Глава 3. Методы стерилизации	29
3.1. Стерилизация питательных сред.....	29
3.2. Стерилизация стеклянной посуды	37
3.3. Стерилизация инструментов и приборов	38
Глава 4. Культивирование и хранение микроорганизмов	43
4.1. Принципы составления сред для культивирования микроорганизмов	43
4.2. Условия культивирования микроорганизмов	56
4.3. Хранение микроорганизмов	65
Глава 5. Выделение чистых культур микроорганизмов	71
5.1. Получение накопительной культуры	71
5.2. Выделение чистой культуры	73
5.3. Определение чистоты выделенной культуры	60
Глава 6. Морфология и цитология микроорганизмов	81
6.1. Микроскопия	81
6.2. Изучение микроорганизмов в световом микроскопе.....	97
6.3. Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии	112
6.4. Методы приготовления препаратов микроорганизмов для электронной микроскопии	114
Глава 7. Количественный учет микроорганизмов	117
7.1. Определение количества клеток	117
7.2. Определение биомассы взвешиванием	129
7.3. Определение количества клеток и биомассы нефелометрическим методом	130
Глава 8. Определение состава клеток микроорганизмов	133
8.1. Методы разрушения клеток	133
8.2. Определение белка	138
8.3. Анализ нуклеиновых кислот	142
8.4. Определение поли- β -оксимасляной кислоты (ПБОМК)	147

	8.5. Выделение и анализ полисахаридов	147
	8.6. Изучение состава клеточных стенок микроорганизмов.....	148
Глава 9.	Культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов	151
	9.1. Культуральные свойства	151
	9.2. Физиолого-биохимические свойства	155
Глава 10.	Генетика микроорганизмов	172
	10.1. Основные понятия	173
	10.2. Мутагенез	173
	10.3. Отбор мутантов	179
	10.4. Перенос генетической информации у бактерий	182
Глава 11.	Систематика и идентификация микроорганизмов	189
	11.1. Основные понятия и правила наименования.....	189
	11.2. Описание и идентификация	193
Приложение		
	Среды для культивирования различных микроорганизмов	202
	Условия хранения и допустимые сроки периодических пересевов некоторых гетеротрофных микроорганизмов	208
	Рецепты красителей, индикаторов и растворов.....	210
Литература	218

Учебное издание

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО
МИКРОБИОЛОГИИ**

Зав. редакцией *И. И. Щехура*
Редактор *Г. М. Полехова*
Художественный редактор *Л. В. Мухина*
Переплет художника *Л. Е. Безрученкова*
Технический редактор *Н. И. Смирнова*
Корректоры *И. В. Бабаева, В. В. Конкина*

ИБ № 8168

ЛР № 040414 от 27.03.92

Сдано в набор 28.06.95. Подписано в печать 10.11.95. Формат 60×90^{1/16}
Гарнитура литературная. Бумага офс. кн.-журн. Печать высокая.
Усл. печ. л. 14. Уч.-изд. л. 15,71. Тираж 1000. Заказ 1356.

Ордена «Знак Почета» издательство Московского университета.
103009, Москва, ул. Б. Никитская, 5/7.

Серпуховская типография Упрполиграфиздата Мособлисполкома
проезд Мишина, д. 2/7