

Т.М. Царенко

МИКРОБИОЛОГИЯ

Практикум

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Ц18

Автор: старший преподаватель кафедры ботаники УО «ВГУ им. П.М. Машерова» **Т.М. Царенко**

Рецензент: заведующий кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М. Машерова», доктор биологических наук, профессор
А.А Чиркин

Данный практикум предназначен для студентов биологического факультета при подготовке и выполнении лабораторных и самостоятельных работ по курсу «Микробиология», содержит необходимый информационный материал, тестовые задания и вопросы программы для подготовки к зачету и экзамену.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

© Царенко Т.М., 2005
© УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2005

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Программа курса «Микробиология»	5
ТЕМА I. Введение. Структурная организация прокариотной клетки..	11
ТЕМА II. Техника микроскопирования микробиологических объектов: приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов. Движение микроорганизмов	20
ТЕМА III. Цитохимические методы изучения клеток микроорганизмов. Дифференциальные способы окраски клеток прокариот. Рост и размножение микроорганизмов	23
ТЕМА IV. Цитохимические методы изучения клеток микроорганизмов; методы выявления эндоспор и капсул	25
ТЕМА V. Коллоквиум. Строение бактериальных оболочек и надоболочечных структур	29
ТЕМА VI. Коллоквиум. Строение бактериальной клетки. Организация цитоплазмы. Эндоспоры. Генетический аппарат ...	30
ТЕМА VII. Коллоквиум. Питание прокариот	32
ТЕМА VIII. Питание прокариот. Культивирование бактерий. Питательные среды и методы стерилизации	33
ТЕМА IX. Принципы современной классификации микроорганизмов. Идентификация и классификация микроорганизмов по культурным признакам	39
ТЕМА X. Микрофлора воздуха, воды, почвы	44
ТЕМА XI. Метаболизм прокариот	49
ТЕМА XII. Коллоквиум. Прокариоты и окружающая среда	53
ТЕМА XIII. Коллоквиум. Метаболизм прокариот	55
ТЕМА XIV. Коллоквиум. Участие микроорганизмов в процессе трансформации основных биогенных элементов	56
ТЕМА XV. Коллоквиум. Основы вирусологии	57
Вопросы для зачета по микробиологии с основами вирусологии	59
Тестовые задания для проведения письменного контроля (приводится примерный перечень)	62

ВВЕДЕНИЕ

Практикум предназначен для студентов биологического факультета, изучающих микробиологию в объемах, предусмотренных учебным планом на разных специальностях факультета. Цель данного издания состоит в оказании помощи студентам при подготовке и выполнении лабораторного практикума по предмету, а также для выполнения самостоятельных заданий и при подготовке к экзамену и (или) зачету.

Основой лабораторных занятий по микробиологии является самостоятельная проработка материалов лекций и учебной литературы по предмету по каждой теме практикума. Настоящие методические указания помогут при самостоятельной работе и подготовке к лабораторным темам. По каждой теме предлагаются наиболее важные вопросы, информационный материал и иллюстрации, наиболее нужные для работы по темам. Заключительный контроль знаний предусматривает выполнение тестовых заданий и знание наиболее важных вопросов курса.

Студенты должны в процессе лабораторного практикума научиться:

- с соблюдением правил техники безопасности и охраны труда проводить работу с культурами микроорганизмов;
- готовить препараты фиксированных и нативных (прижизненных) микроорганизмов;
- осуществлять анализ санитарно-гигиенических характеристик объектов окружающей среды;
- анализировать данные лабораторных работ и интерпретировать их результаты, прогнозировать и моделировать возможные варианты состояний объектов окружающей среды;
- исследовать культуральные свойства разных групп микроорганизмов и уметь готовить простейшие питательные среды;
- определять основные физиологические группы микроорганизмов и наиболее характерные для них продукты жизнедеятельности;
- знать основные типы энергетического и конструктивного обмена, характеристики разных типов брожения и микроорганизмов брожения.

При выполнении лабораторного практикума студент должен вести лабораторную тетрадь (альбом для рисования), иметь карандаши (цветные и простой). Каждая тема выполняется в тетради заблаговременно, согласно заданиям лабораторной работы. После выполнения лабораторной работы тема должна быть сдана преподавателю, с выставлением оценки, затем отчет подписывается преподавателем. Каждая работа сопровождается рисунками, выполненными цветными или простыми карандашами, соответственно используемым красителем, рисунки сопровождаются указанием увеличения и способа микроскопии, с указанием объектов (микроорганизмов). К зачету или экзамену допускаются студенты, которые в полном объеме выполнили лабораторный практикум, работы которых сданы преподавателю и имеют положительную оценку.

ПРОГРАММА КУРСА «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Тема 1. Введение в микробиологию

Предмет и задачи микробиологии: ее место и роль в современной биологии. Краткая сравнительная характеристика структурной организации прокариотного и эукариотного типа клеток. Выделения бактерий и цианобактерий в самостоятельное царство прокариот. Специфические черты прокариотных организмов.

Значение микробиологии для народного хозяйства и охраны здоровья. Роль микроорганизмов в процессах круговорота биогенных элементов в природе. Значение микроорганизмов в жизни и хозяйственной деятельности человека. Патогенные микроорганизмы и борьба с инфекционными заболеваниями. Использование микроорганизмов в промышленности. Разделы микробиологии: общая микробиология, медицинская, ветеринарная, сельскохозяйственная, техническая, космическая, вирусология, генетика микроорганизмов. Задачи различных направлений микробиологической науки.

Промышленная микробиология и микробиологическая технология, перспективы развития этих отраслей. Научные основы микробиологической промышленности, современная биотехнология и ее возможности в решении проблем, стоящих перед человечеством: производство пищевого белка, пополнение дефицита природных ресурсов, очистка окружающей среды от загрязнения. Разработки, направленные на запросы различных отраслей промышленности.

Методы микробиологических исследований: микроскопия, выделение чистых культур микроорганизмов и культивирование их, идентификация и др. Правила работы в микробиологических лабораториях.

Тема 2. Возникновение и развитие микробиологии

Открытие микромира А. ван Левенгуком (1695 г.). Морфологический период в микробиологии.

Работы Л. Пастера (1822–1895), заложившие основы физиологического направления в микробиологической науке. Исследования Р. Коха (1843–1910), И. И. Мечникова (1845–1916), Д.К. Заболотного (1866–1929), П. Эрлиха (1854–1915) и др.

Работы основоположников почвенной микробиологии С.Н. Виноградского (1856–1953) и М. Бейеринка (1851–1931).

Открытие вирусов Д.И. Ивановским (1864–1920). Первые успехи вирусологии.

Развитие биохимического направления в микробиологии. Работы А. Клейвера (1888–1956) и К. ван Нилля, доказавшие биохимическое единство живых организмов.

Основные направления развития современной микробиологии. Концепция биохимического единства живых организмов.

Тема 3. Морфология и структурно-функциональная организация прокариот

Особенности морфотипов прокариот. Уровни клеточной организации прокариот, их отличие от эукариот. Морфологическая дифференциация. Морфогенез. Особенности морфологической структуры цианобактерий, актиномицет, архебактерий.

Постоянные и временные структуры бактериальной клетки. Клеточная стенка. Окраска по Граму. Отличие клеточной стенки грамположительных прокариот от грамотрицательных. Структура, химический состав и функции клеточной стенки. Бактериальные протопласты и сферопласты, Л-формы бактерий.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), строение и функции. Транспорт веществ через ЦПМ. Производные ЦПМ и их функции. Органоиды цитоплазмы и их функции. Мезосомы, хроматофоры, тилакоиды, везикулы. Цитозоль. Ядерный аппарат (нуклеоид): химическая и структурная организация, функции.

Модель структуры ДНК Уотсона-Крика. Различные формы организации двуцепочечной ДНК. Репликация бактериальной хромосомы. Механизм репликации и сегрегации бактериальной хромосомы. Рибосомы, их строение и отличие от рибосом эукариот.

Структура РНК. Поверхности структуры бактериальной клетки. Капсула, слизистые чехлы, ворсинки. Жгутики, их строение, размещение на клетке, механизм функционирования. Скользящий тип движения миксобактерий, микоплазм, нитчатых серобактерий и цианобактерий. Пили, ворсинки (фимбрии) общего типа, половые пили, шипы. Внутриплазматические включения. Аэросомы, карбоксисомы, магнитосомы, фикобилисомы.

Морфологическая дифференцировка клеток прокариот (эндоспоры, экзоспоры, цисты, гетероцисты, акинеты, гормогонии). Эндоспоры бактерий. Химический состав, строение, особенности спор. Запасные питательные вещества.

Тема 4. Физиология прокариот

Химический состав прокариотной клетки. Ферменты. Коферменты. Конституционные и индуцибельные ферменты. Классификация ферментов. Роль ферментов в жизни микроорганизмов. Регуляция активности синтеза ферментов. Факторы роста бактериальной клетки. Питание прокариот. Ассимиляция углекислоты автотрофами и гетеротрофами. Органотрофы, литотрофы. Ассимиляция азота.

Физиологические группы прокариот. Фототрофы, хемотрофы. Ауксотрофы, прототрофы. Миксотрофы. Сапрофиты и паразиты.

Поступление питательных веществ в клетку прокариот (пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный перенос). Метаболизм. Энергетический и конструктивный метаболизм.

Источники и способы получения энергии. Брожение. Типы брожения: спиртовое, маслянокислое, молочнокислое (гомоферментативное и гетероферментативное), пропионовокислое, уксуснокислое и т.д. Фотосинтез. Хемосинтез. Анаэробное, аэробное дыхание. Неполное окисление. Нитратное, карбонатное, сульфатное дыхание. Роль в природе метанообразующих, нитрифицирующих и других прокариот. Регуляция клеточного метаболизма. Регуляция синтеза и активности ферментов. Пути метаболизма. Путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса. Гликолиз. Путь Варбурга–Диккенса–Хорекера (пентозофосфатный). Путь Энтнера–Дудорова. Регуляция различных метаболических путей. Основные механизмы, регулирующие катаболические пути. Формы запасаания энергии в клетках прокариот. Субстратное фосфорилирование. Окислительное и фотосинтетическое фосфорилирование. Синтез молекул АТФ. Электронно-транспортные цепи. Доноры и акцепторы электронов. Трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода. Образование протонного потенциала на ЦПМ как источника энергии для регенерации АТФ. Ионный обмен.

Разнообразные типы жизни прокариот. Классификация прокариот по типу жизни. Типы жизни, основанные на фотосинтетическом фосфорилировании. Бактериальный фотосинтез и его отличие от фотосинтеза растений. Фотопигменты. Фотосистемы. Группы фотосинтезирующих прокариот. Группы хемосинтезирующих прокариот. Галобактерии, биологические особенности. Биолюминисценция. Биосинтез углеводов, нуклеотидов, белков, жирных кислот и фосфолипидов. Механизмы влияния физических, химических и биологических факторов на жизнедеятельность.

Тема 5. Рост, размножение, культивирование прокариот

Чистые культуры прокариот. Популяция прокариот. Микробные популяции: колонии, биопленки, зооглеи – своеобразные организмы. Методы их получения.

Понятие роста, размножения. Основные параметры роста культур: время генерации прокариот, скорость роста и выход биомассы. Закономерность роста бактерий в периодической чистой культуре. Кривая роста, фазы роста бактериальной популяции. Непрерывные и синхронные культуры.

Культивирование иммобилизационных клеток микроорганизмов. Особенности культивирования анаэробных и аэробных бактерий. Влияние на рост микроорганизмов кислотности среды (pH) и молекулярного кислорода (O_2).

Тема 6. Генетика прокариот

Фенотипическая и генотипическая изменчивость прокариот. Генотип, фенотип. Геном прокариот. Структура генома прокариот. ДНК–носитель генетической информации. Опероны. Принцип организации бактериальной хромосомы. Механизм функционирования оперонов. Особен-

ности репликации ДНК у прокариот. Генетический код. Трансляция генетического кода.

Молекулярные основы генетического механизма синтеза белка. Экспрессия (проявление) гена. Регуляция синтеза белка.

Мутации. Спонтанные, индуцированные мутации. Классификация мутаций: генные, хромосомные, внутрихромосомные (делеции, дупликации, инверсии). Молекулярные основы мутационного процесса. Мутагенные факторы. Плазмиды: F-плазмиды, R-плазмиды, плазмиды патогенности и др. Транспазоны. Взаимодействие плазмид с бактериальной хромосомой. Роль плазмид (азотфиксация, образование клубеньков и др.). Рекомбинация генетического материала прокариот. Трансформация, трансдукция, конъюгация. Умеренные фаги. Фаговая конверсия некоторых признаков бактерий.

Тема 7. Участие микроорганизмов в процессах трансформации основных биогенных элементов

Участие микроорганизмов в биологическом круговороте веществ в природе. Процессы трансформации углеродсодержащих веществ. Разложение целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и пектина. Трансформация углеводов.

Процессы трансформации азотсодержащих веществ. Аммонификация белков, нуклеиновых кислот и мочевины. Нитрификация. Денитрификация. Биологическая фиксация молекулярного азота. Свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие бактерии. Гипотеза химизма азотфиксации. Значение биологической азотфиксации в азотном балансе экосистемы.

Процессы трансформации соединений фосфора. Минерализация фосфорорганических соединений растительного и животного происхождения. Трансформация неорганических соединений фосфора.

Процессы трансформации соединений серы. Минерализация серосодержащих органических веществ. Сульфификация и десульфификация.

Процессы трансформации соединений железа.

Тема 8. Систематика и классификация прокариот

История развития систематики и классификации прокариот. Международный кодекс номенклатуры прокариот. Международная классификация прокариот. Таксономические категории. Группы прокариот по Определителю бактерий Берги. Отделы царства: Procaryotae: 1) Gracillicutes; 2) Firmicutes; 3) Tenericutes; 4) Mendosicutes.

Характеристика основных групп бактерий.

Фототрофные бактерии.

Хемотрофные бактерии.

Миксобактерии.

Риккетсии.

Спирохеты.
Псевдомонады.
Свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы.

Группа молочнокислых бактерий.
Бактерии группы кишечной палочки.
Пропионовокислые бактерии.
Споросоздающие бактерии.
Актиномицеты.
Архебактерии.
Микобактерии.

Тема 9. Экология прокариот

История учения. Основоположники экологического направления в микробиологии (С.Н. Виноградский, В.Л. Омелянский).

Распространение микроорганизмов в природе.

Влияние физических и химических факторов среды на бактерии: влажность, солнечная энергия, ультразвук, реакция среды, кислород, антисептики.

Взаимоотношения микроорганизмов. Ассоциативные взаимоотношения: метабиоз, симбиоз, комменсализм, сателлизм. Конкурентные взаимоотношения: антагонизм, паразитизм.

Антибиотики. Продуценты антибиотических веществ. Механизм действия антибиотиков. Спектр действия. Антибиотикорезистентность бактерий.

Взаимоотношения микроорганизмов с растениями. Микрофлора ризосферы. Эпифитная микрофлора растений. Фитопатогенные микроорганизмы.

Взаимоотношения микроорганизмов с человеком и животными. Нормальная микрофлора человека и животных. Патогенные микроорганизмы. Инфекции. Имунитет. Факторы и механизмы естественной устойчивости. Имунная система и ее функции. Центральные и периферические органы имунной системы. Химия антигенов, их особенности. Химия антител. Моноклональные антитела. Молекулярная структура антител. Взаимоотношение антител с антигенами. Виды имунитета. Механизм имунного ответа. Клеточный и гуморальный имунитет. Иммуногенетика. Генетика патогенности микроорганизмов. Гены и генные продукты, участвующие в формировании патогенного генотипа (а также вирусолентного фенотипа) микроба. Механизм взаимоотношения партнеров в системе паразит-хозяин.

Понятие о стерилизации (асептики, антисептики) и дезинфекции. Пастеризация.

Тема 10. Основы вирусологии

Происхождение вирусов. РНК-, ДНК-геномные вирусы. Структурная организация вириона. Капсиды.

Взаимоотношение вирусов с клеткой хозяина. Цикл репродукции вирусов. Хемосорбция вируса на поверхности клетки хозяина. Проникновение вируса в клетку. Реакция организма в ответ на вирусную инфекцию. Депротеинизация вируса. Синтез компонентов вируса. Морфогенез вируса. Выход вируса из клетки. Формы вирусной инфекции. Культивирование вирусов. Вирусный канцерогенез.

Понятие о вириодах, прионах и др. Прионы – «инфекционные белки», вызывающие медленно протекающие инфекции у животных и человека.

Бактериофаги. Морфотипы бактериофагов. Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой. Лизогения. Фаговая конверсия. Резистентность фагов к физическим и химическим факторам. Практическое использование бактериофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1992.
2. Генкель П.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1980.
3. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология. – М., 1990.
4. Жизнь растений: В 6 т. / Под ред. А.А. Федорова. – М., 1974–1982.
5. Колешко О. Микробиология. – Мн., 1977.
6. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987.
7. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. – М., 1990. – Т. 1–2.
8. Стейнер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. – М., 1979. – Т. 3.
9. Стрельская О.Я. Низшие растения. Систематика / Под ред. Н.А. Дорожкина. – Мн., 1985.
10. Чурикова В.В., Викторов Д.П. Основы микробиологии и вирусологии. – Воронеж, 1989.
11. Шлегель Г. Общая микробиология. – М., 1972.

ТЕМА I. Введение. Структурная организация прокариотной клетки

Правила работы в микробиологической лаборатории. Основы техники микроскопии с микробиологическими объектами; иммерсионные объективы и правила работы с ними. Приготовление препаратов фиксированных клеток микроорганизмов.

Материал и оборудование: чистые обезжиренные предметные стекла, спиртовки, бактериологические петли, вода дистиллированная стерильная; колбы с водой; наборы красителей, культуры в пробирках на ко- сых срезах плотных сред, микроскопы с объективами малого увеличения и иммерсионными, иммерсия (кедровое масло), кристаллизаторы с подстав- ками, плакаты по теме, видеоустановка.

Цели занятия и задания:

1. Изучить правила работы в микробиологической лаборатории и за- писать основные в тетрадь; выяснить правила ТБ в лаборатории и выпол- нять их на каждом занятии;
2. Повторить устройство микроскопа и изучить типы микроскопии, записать основные правила работы с иммерсионной системой и иммерси- онным объективом;
3. Изучить правила работы с культурами микроорганизмов и нау- читься готовить препараты фиксированных клеток: метод фиксированных окрашенных препаратов;
4. Изучить морфологические типы клеток бактерий и характер их расположения.

Задание 1.1. Запишите в тетрадь основные правила работы и ТБ в микробиологической лаборатории. Изучите правила работы с культурами микроорганизмов.

Задание 1.2. Запишите в тетради правила работы с иммерсионным объективом, укажите преимущества этой системы для работы с микроор- ганизмами. Дайте краткую характеристику типам микроскопии.

Задание 1.3. Изучите методику приготовления препаратов фиксиро- ванных клеток, запишите основные этапы: приготовление мазка; высуши- вание; фиксация и окраска; опишите технику этих этапов и значение. От- работайте отдельные приемы.

Приготовьте фиксированный препарат и рассмотрите его под ма- лым и большим (иммерсионным) увеличением. *Зарисуйте* рисунки, ука- жите тип клеток по морфологии и расположению. *Определите* присутст- вие эндоспор.

Информационный материал

Правила и техника безопасности при работе в микробиологической лаборатории

1. Заходить и работать в микробиологической лаборатории только в халате.
2. Не вносить в лабораторию посторонних вещей.
3. Работать на одном и том же месте и пользоваться закрепленным оборудованием.
4. Соблюдать чистоту и опрятность при работе.
5. Во избежание заражения во время перерывов не принимать пищу.
6. На столе должно быть только необходимое для выполнения задания.
7. По окончании занятий рабочее место и оборудование приводить в порядок.
8. Во избежание взрыва не зажигать одну спиртовку от другой, использовать для этой цели спички, зажигалку.
9. Не соприкасаться с металлическими и другими предметами с проводами и контактными частями электросети.
10. Без разрешения преподавателя или обслуживающего персонала не включать электроприборы и аппаратуру.
11. Соблюдать правила обращения с химическими и другими реактивами.
12. Уходя из лаборатории, вымыть руки.
13. К работе в лаборатории допускаются лица только после прохождения инструктажа по технике безопасности.
14. Результаты работы следует занести в рабочий журнал.

МИКРОСКОПИЯ

Правила работы с иммерсионным объективом

Сухой окрашенный препарат (приготовление см. ниже) помещают на столик микроскопа и, пользуясь объективом 8х, устанавливают свет по Келлеру. Затем в центр препарата на мазок наносят каплю иммерсионного масла и заменяют сухую систему иммерсионной. Под контролем глаза, глядя сбоку, опускают тубус микроскопа (с помощью макрометрического винта) до погружения объектива в масло. Эту операцию нужно проводить очень осторожно, следя за тем, чтобы фронтальная линза не коснулась предметного стекла и не получила повреждения. Необходимо иметь в виду, что фронтальная линза высокоапертурных иммерсионных объективов слабо держится в оправе и при грубом обращении легко может сместиться. После погружения объектива в масло осторожно, также пользуясь макровинтом, поднимают тубус и, наблюдая в окуляр, находят плоскость препарата. Точная фокусировка производится с помощью микрометрического винта.

По окончании микроскопирования поднимают тубус, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива сначала су-

хой хлопчатобумажной салфеткой, но слегка смоченной бензином. 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. Очищать объектив от иммерсионного масла ксилолом не рекомендуется, так как последний может растворить состав, склеивающий линзы объектива. Препарат освобождают от масла сначала кусочком фильтровальной бумаги, а затем обрабатывают стекло либо бензином, либо кислородом.

Увеличение, которое дает микроскоп, равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например: окуляр 15(10,7)х и объектив 90х, можно получить увеличение в 1350 раз.

Отчетливость изображения объектива определяется (D) разрешающей способностью, под которой понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они не сливаются в одну. Величина разрешающей способности микроскопа зависит от длины волны света (λ) и суммы числовых апертур объектива (A_1) и конденсора (A_2):

$$D = \frac{\lambda}{A_1 + A_2}.$$

Числовая апертура определяется произведением синуса половины (u) и отверстного угла (A) на показатель преломления (n) среды, граничащей с линзой:

$$A = \sin u \cdot n.$$

Таким образом, иммерсионная система микроскопа:

- 1) увеличивает общее увеличение – $15 \times 90 = 1350$;
- 2) улучшает четкость получаемого изображения за счет разрешающей способности. Апертуры сухих объективов – 0,20 и 0,65, а масляных 1,25.

ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

С помощью этого метода усиливается контрастность неокрашенных объектов. Впервые (1934) явление фазовой контрастности было подмечено голландским физиком Ф. Цернике, который изменил фазу световой волны и сделал ее видимой путем нанесения на линзу фазово-контрастного объектива кольцеобразного серого слоя. Фазово-контрастное приспособление состоит из фазово-контрастных объективов (хроматидов), револьверного конденсора с диафрагмами и вспомогательного микроскопа.

Фазовые объективы отличаются от обычных тем, что имеют фазовую пластинку в виде темного кольца, которая помещается на внутренней поверхности линз. Конденсор такой же, как и у обычных микроскопов, но соединен с револьверным устройством. При вращении пластинки револьвера сменяются кольцевые диафрагмы. Вспомогательный микроскоп слу-

жит для центрирования кольцевой диафрагмы по отношению к фазовой пластинке объектива.

При наводке револьвера пластинку ставят на ноль, освещение устанавливают по Келеру, вместо окуляра используют вспомогательный микроскоп. Кольца, появляющиеся в поле зрения, совмещают при помощи центрировочных винтов конденсора. Вспомогательный микроскоп заменяют окуляром, а в окне кожуха конденсора устанавливают такую же цифру, как и на объективе. Свет от лампы должен проходить через зеленый светофильтр и полностью открытую диафрагму.

АНОПТРАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

В 1953 г. финским физиологом А. Вильска предложен аноптральный микроскоп, который является дальнейшим усовершенствованием фазового контраста. Он покрыл слоем сажи одну из линз объектива, затем на часовом токарном станке мягким материалом протер кольцеобразную поверхность. Предмет при использовании такого объектива с кольцеобразной диафрагмой соответствующей апертуры получается темным на светлом фоне без световых ореолов.

В 1955 г. М.А. Пешков предложил объективы – люки, в которых кольцо копоти расширено до краев линзы, что препятствует проникновению периферического диафрагмированного света. Вместо кольцевой диафрагмы в конденсор установлена центральная диафрагма.

В 1960 г. С.Б. Стефановым был предложен третий вариант аноптрального микроскопа. В центральной части одной из линз объектива автор нанес полупрозрачную металлическую пленку. При настройке апертурная диафрагма сужается на столько, чтобы ее края немного заходили за границы диска в объективе. Изображение в таком микроскопе получается четким, мягким и без ореолов. Аноптральная микроскопия может быть использована при изучении структуры клеток.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесценция – свечение микроскопических объектов, которое может быть выявлено с помощью увеличивающих оптических приборов. Первый люминесцентный микроскоп сконструирован в 1908 г. А. Келером и Г. Зидентпфом. В 1910 г. они продемонстрировали такой прибор на курсах научных микроскопистов в Вене.

При действии на объект невидимыми ультрафиолетовыми или синеволновыми лучами с короткой длиной волн возбуждается люминесценция с более длинной световой волной, видимой глазом человека. Это свойство положено в основу люминесцентной микроскопии.

Для люминесцентной микроскопии используют микроскопы серии МЛ и «Люам». Люминесцентный микроскоп МЛ-2 состоит из сильного

источника света (ртутно-кварцевая лампа), светофильтров и биологического микроскопа. Между источником света и зеркалом микроскопа устанавливается сине-фиолетовый фильтр. Луч света с короткой волной, попадая на препарат, возбуждает в нем свечение. На окуляр микроскопа надевают желтый светофильтр, который отсекает сине-фиолетовые лучи (коротковолновую часть спектра) и пропускает длинноволновые лучи, видимые глазом.

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Первый электронный микроскоп был сконструирован в 1928–1931 гг. М. Кноллем и Э. Руска. В электронном микроскопе пучок света заменен потоком электронов. Длина волны электронных лучей во много раз короче длины световых лучей, что позволяет получить большее увеличение и рассматривать объекты, невидимые в световом микроскопе. Различают электронные микроскопы: просвечивающие (ПЭМ), растровые (РЭМ), эмиссионные, зеркальные и др.

В электронном микроскопе линзами являются магнитные поля соответствующей конфигурации. Источником электронов служит катод. Движение электронов осуществляется по направлению к аноду, который находится в верхней части конденсора линзы. На пути к объекту пучок электронов дважды фокусируется конденсорами. После объекта нерассеянные электроны проходят через отверстие диафрагмы и снова фокусируются, но уже объективом промежуточной линзы. Затем сфокусированное здесь увеличенное изображение проецируется последующими линзами на люминесцентный (флуоресцирующий) экран.

РАСТРОВАЯ (СКАНИРУЮЩАЯ) ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Растровый электронный микроскоп (РЭМ) дополняет возможности обычного светового и электронного микроскопов: имеет высокую разрешающую способность (РС), большую глубину резкости, дает трехмерное изображение исследуемых объектов. Основными частями РЭМ являются: электронная пушка, система линз, коллектор электронов, электронно-лучевые трубки (ЭЛТ) для наблюдения, съемки и связанная с ними система электроники.

В РЭМ сфокусированный электронный пучок (зонд) разворачивается в виде раstra по поверхности объекта. В результате взаимодействия пучка с поверхностью непросвечиваемого (массивного) объекта отражаются первичные и «выбиваются» вторичные электроны, которые собираются коллектором, преобразуется в электрический сигнал, усиливается и подается на ЭЛТ, где производится развертка пучка и на экране появляется увеличенное изображение участка объекта, откуда производят его фотографирование. РЭМ имеет большую глубину фокуса (0,6–0,8) и при накло-

не поверхности объекта по отношению к пучку электронов позволяет получать трехмерное изображение.

Первый упрощенный РЭМ со сканирующим лучом был построен в 1935 г. М. Кноллем. Наиболее совершенный РЭМ, работающий по принципу сканирования, то есть последовательного перемещения тонкого электронного пучка по поверхности объекта с использованием вторичных электронов для формирования изображения, был описан в 1942 г. В.К. Зворикиным и др. (США). Первая же промышленная установка РЭМ появилась в 1965 г. (Англия, Кембридж).

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Атомно-силовые микроскопы (АСМ) появились на рубеже XX и XXI века. Микроскопия с помощью АСМ позволяет не только рассмотреть поверхность клеток, но и получить информацию о вязкоупругих и адгезивных свойствах, недоступную при других методах исследования структур и клеток. АС микроскопия принадлежит новому классу зондовых микроскопий, общим принципом работы которой является сканирование объектов при помощи прецизионных пьезоэлектрических микроманипуляторов. Действие таких микроманипуляторов основано на свойстве некоторых материалов (пьезокерамики) изменять свои геометрические параметры под действием электрического напряжения. Благодаря АСМ можно осуществлять заданные перемещения с точностью до долей ангстрема. АСМ дает трехмерное изображение профиля поверхности.

Первый АСМ был сконструирован в 1986 году Биннигом, Квейтом, Гербером. Преимущества использования АСМ:

- подходит для биологических объектов;
- не требует сложной подготовки для фиксации и контрастирования, как электронный микроскоп;
- возможность неразрушающей визуализации объекта;
- осуществляется в жидкой среде;
- дает возможность исследовать вязкоупругие и адгезивные характеристики исследуемых объектов.

Отличия прокариот:

1. Наличие единственной цитоплазматической мембраны (ЦПМ).
2. Отсутствие органоидов, ограниченных ЦПМ.
3. Ядра нет, ДНК в виде хромосомы, ДНК стабилизирована не гистонами, а веществами – полиаминами.
4. Наличие внехромосомных единиц наследственности: плазмид, эписом.
5. Клеточная стенка содержит муреин–пептидогликан.
6. Наличие особых запасных веществ: волютин, гранулеза, полироксимасляная к-та и др.

7. Рибосомы 70S типа (у эукариот-80S тип).
8. Наличие жгутиков, обуславливающих движение.
9. Наличие капсул (микро-, макро) или слизи на поверхности клеток.
10. Бинарное деление (без митоза, т.к. нет ядра).
11. Способность переносить неблагоприятные факторы окружающей среды в виде эндоспор (G^+), экзоспор, цист, др.
12. Отсутствие фаго-, пиноцитозов, движения цитоплазмы (нет микротрубочек и микрофиламентов в цитоплазме).
13. Размеры микроорганизмов – от 0,5–3 мкм (в среднем).

I. Кокки (шаровидные): микрококки, стрептококки, стафилококки, диплококки, тетракокки (гаффкия), сарцины.

II. Палочковидные – цилиндрические с разными формами концов, одиночные или в цепочках, спорообразующие (бациллы) и не образующие спор (палочки).

III. Извитые: а) вибрионы – палочковидные короткие клетки в виде запятой;

б) спириллы – клетки имеют от 4 до 6 завитков;

в) спирохеты – клетки имеют от 6 до 15 витков, имеют аксиальную нить или кристу, способны к внутриклеточному движению.

IV. Простеко-бактерии;

V. Звездчатые формы, формы тороида (замкнутого или неполного круга).

VI. Колониальные формы (архебактерии).

ЦПМ – обязательный структурный элемент клетки прокариот. Структура и жидкостно-мозаичная модель ЦПМ: билипидный слой и структурные белки (поверхностные периферические; собственно периферические и интегральные). Жидкостное и квазикристаллическое состояния определяются подвижностью билипидного слоя и расположением белковых молекул.

Функции ЦПМ: восприятие сигналов внешней среды; ферментативная функция (пермеазы и др.), регуляторная, функция разделения внутреннего объема клетки на отсеки (компарменты) – отсутствует у прокариот; в мембране локализованы дыхательные ферменты;

Транспортная функция ЦПМ и основные типы транспорта:

1. Пассивная диффузия – происходит без затрат энергии, определяется градиентом концентрации или градиентом электрических потенциалов для ионов.

2. Облегченная диффузия – участвуют пермеазы (транслоказы, переносящие вещества субстрата на разные поверхности ЦПМ).

3. Активный транспорт – идет против градиента концентрации с участием пермеаз, с затратой Q (АТФ).

4. Перенос радикалов – сложный энергозависимый процесс с помощью систем ферментов.

ЦПМ образует у наиболее высокоорганизованных прокариот внутрицитоплазматические мембранные образования: мезосомы и тилакоиды (хроматофоры). Выделяют три типа мезосом: ламеллярные (пластинчатые), везикулярные (пузырьковидные), тубулярные (трубчатые). Различают смешанный тип мезосом.

Усовершенствовал микроскоп (снижена сферическая аберрация) и предложил иммерсию итальянский ученый Дж. Амичи (1827 г.). Фазово-контрастный микроскоп изобрел в 1938 г. голл. ученый-физик Ф. Цернике (1888–1966). Примерно в это же время в Берлине М. Кнолл и Э. Руска сконструировали электронный микроскоп, работающий за счет рассеивания объектом потоков электронов (разрешающая способность $1,5\text{--}3\text{Å}$).

Микроскопический метод исследования применяют для изучения морфологии микроорганизмов. Микроорганизмы, выращенные на питательной среде, называют культурой.

Техника приготовления фиксированного препарата.

Этапы приготовления препарата фиксированных клеток: приготовление мазка, высушивание мазка, фиксация мазка и окраска препарата.

1. На подготовленное предметное стекло петлей наносят небольшое количество воды (1–2 капли). Культуру бактерий осторожно, не затрагивая слой питательной среды, снимают петлей, соблюдая правила работы с культурой. Культуру эмульгируют в капле воды и равномерно, по возможности тонко, распределяют в центре предметного стекла, размазывая петлей. При правильном выполнении мазок выглядит как слабый налет.

2. Мазок сушат на воздухе или над пламенем спиртовки в теплом токе воздуха. Внимание! Нельзя держать мазок в горячей части пламени, так как при этом нарушается структура клеток.

3. Фиксация выполняет следующие задачи: а) закрепляет клетки микроорганизмов, б) обезвреживает материал культуры, в) улучшает – тинкториальные свойства клеток, то есть отношения микроорганизмов к красителям и способность окрашиваться.

4. Окраска препаратов. Зафиксированный препарат помещают на препаратодержатель, пипеткой капают нужный краситель, не касаясь препарата, или помещают на препарат бумажку с красителем, смачивая ее водой. Очень концентрированные красители можно помещать на фильтровальную бумажку, накрывая бумажкой препарат. Спустя 1–2 минуты краситель смывают водой.

Методы окраски делят на простые (ориентировочные), когда используют один краситель, и сложные (дифференциальные), при которых используют несколько красителей в разной последовательности.

Задание на дом: подготовить тему «Структурная организация прокариотной клетки. Строение клеточных оболочек и внутриклеточных структур микроорганизмов».

Самостоятельная работа

Изучив тему, ответить на вопросы:

Контрольные вопросы

1. Отличительные черты и особенности прокариот.
2. Структурная организация клеток прокариот.
3. Основные морфологические типы клеток микроорганизмов.
4. Специфические методы исследования микроорганизмов, типы микроскопии.
5. Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
6. Цитоплазма и ее включения, запасные вещества прокариот.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое посев (инокуляция) микроорганизмов?
2. Для чего применяют фламбирование?
3. Какие цели преследует фиксация клеток микроорганизмов?
4. Чем отличаются кислые и основные красители и позитивное и негативное окрашивание?
5. На какие показатели влияет увеличение объектива?
6. Что такое разрешающая способность микроскопа? Как повысить числовую апертуру?
7. Какие вещества используют для уплотнения сред?
8. Кто предложил иммерсию и каковы ее преимущества?

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. «Строение и жизнедеятельность микроорганизмов». – Витебск, 2002. – С. 5–26.
2. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 17–37.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1979. – С. 27–56.
4. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – С. 12–25.
5. Аникеев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – Изд. 2-е. – М., 1983. – С. 4–5, 14–20, 21, 23–26.

ТЕМА II. Техника микроскопирования микробиологических объектов: приготовление препаратов живых клеток микроорганизмов. Движение микроорганизмов

Материалы и оборудование: предметные и покровные стекла, предметные с углублениями, микробиологические петли; спиртовки, культура сенной и картофельной палочки (накопительные культуры), микроскопы (сухие объективы), плакаты, видеоустановка.

Цели занятия и задания:

1. Изучить: способы и типы движения микроорганизмов; особенности строения органов и структур движения микроорганизмов.
2. Изучить методику приготовления прижизненных препаратов и научиться готовить препараты живых клеток микроорганизмов.
3. Повторить правила работы с микроскопом с сухими объективами, рассмотреть приготовленные препараты, определить характер движения клеток.

Контрольные вопросы

1. Жгутик бактерий, его строение и функции.
2. Типы расположения жгутиков у бактерий.
3. Внутриклеточный тип движения спирохет.
4. Механизм скользящего типа движения.

Вопросы для самоконтроля

1. Как происходит восстановление поврежденного жгутика? Из какого вещества состоит нить жгутика?
2. Каково строение базальных структур у грациликотных бактерий? Почему у фирмикотных бактерий только 2 кольца, а не 4 ?
3. В каких направлениях может двигаться спирохета? Что такое таксис?

Задание II.1. Изучите тему «Клеточные стенки бактерий. Структуры движения микроорганизмов». Запишите в тетради типы движения бактерий, зарисуйте схему строения жгутика и строение (схематическое) спирохеты. Укажите, какие кольца имеет базальная структура и где они расположены в структуре клеточной оболочки. (Г⁺ и Г⁻).

Задание II.2. Запишите методы «раздавленной капли» и метод «висячей капли» для приготовления «прижизненных» препаратов. Запишите методику получения накопительной культуры сенной палочки и картофельной палочки.

Используя суточные культуры сенной палочки, приготовьте препараты живых клеток микроорганизмов.

Задание II.3. Рассмотрите приготовленные препараты при малом и большом увеличении. Найдите наилучшие объекты и определите характер и тип движения. Увиденное зарисуйте, отметив увеличение и характер движения.

Задание II.4. Рассмотрите извитые формы, используя инкубированный настой навозной жижи. Приготовьте фиксированный и окрашенный фуксином препарат. Рассмотрите препарат как демонстрационный, определите тип клеток, зарисуйте типы извитых клеток микроорганизмов.

Информационный материал

I. Жгутик – как орган движения бактерий.

Бактерии были открыты благодаря их движению (Левенгук в 1676 г. наблюдал подвижность микроорганизмов). Локомоторным органом плавающих бактерий является жгутик. Жгутики есть даже у археобактерий, т.е. это очень древнее приобретение и жгутики бактерий не имеет общего с жгутиками эукариот.

По характеру расположения жгутиков различают:

1) монотрихи:

- а) 1–2 жгутика на полюсах *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Thiobacillus*;
- б) или несколько сдвинуто в стороне от полюса *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Seliberia*;

2) лофотрихи – с пучком жгутиков из нескольких десятков отдельных нитей *Spirillum*, археобактерия *Halobacterium* и др.;

3) перитрихи – жгутики по всему телу, а полюса обычно лишены их – это кишечная палочка – *Escherichia*, сальмонеллы *Salmonella*.

(У некоторых бактерий в процессе жизни наблюдаются изменения характера расположения жгутиков, и число жгутиков может увеличиться в 50 раз).

Нить жгутика – белковый цилиндр 12–20 нм толщиной, а более сложно устроенные – до 35 нм. У некоторых бактерий – смешанный тип жгутикования, тогда сложные жгутики имеют дополнительный чехол из белка с молекулярной массой 45000, отличный от белков оболочки. Иногда чехлы образованы тремя спиральными лентами белка (например, штамм H 13–3 *Rhizobium mepini*).

Строение жгутика включает: 1) нить, 2) крюк, 3) базальную структуру.

Нити – трехмерные спирали, часто в состав входит белок с мол. массой 55000, имеет внутренний цилиндр и чехол, на микропрепаратах часто изогнутые. Длина нити равна трем длинам тела м/о (10–20 мкм), но у некоторых спирилл до 70 мкм и более; жесткость нити жгутика в 100 раз больше, чем жесткость нити белка 7-актина. Белок нити жгутика – *флагеллин*.

- обладает антигенной специфичностью, это 11-антиген;
- термоустойчивость – устойчивы к t^0 от 54°C до 77°C;
- устойчивость к кислотам, мочеvine, др.;
- устойчив к протеолитическим ферментам в природном состоянии;
- способность к самосборке нити в различных условиях (либо в прямые или спиральные) при наличии кусочка нити.

Концы жгутика неравноценны: конец, обращенный к бактерии – проксимальный – выпуклый (Н-конец), а дистальный (Т-конец), напоминает хвост рыбы. Рост нити жгутика происходит только с Т-конца. Это доказано экспериментально.

У бактерий обычно один ген отвечает за синтез флагеллина, но у некоторых (*Caulobacter crescentus*) – 2 гена и два белка – Н-конец – флагеллин В, а Т-конец – флагеллин А.

Крюк жгутика – изогнутый белковый цилиндр, 1% от массы жгутика.

II. Механизм скользящего движения до конца не ясен. Согласно ранней гипотезе движение обусловлено выделением слизи через поры в клеточной стенке и отталкиванием от субстрата в направлении, противоположном направлению выделения слизи. Современные воззрения связывают движение с наличием в клеточной стенке белкового слоя из упорядоченных микрофибрилл. Это своеобразные «внутриклеточные жгутики», движение которых приводит к появлению «бегущей волны» на поверхности клетки, и клетка отталкивается от субстрата.

Техника приготовления нативных препаратов микроорганизмов.

Препарат «висячая капля»

Препарат используют для выявления движения бактерий и наблюдения за процессами жизнедеятельности микроорганизмов.

Небольшую каплю микроорганизмов наносят на покровное стекло по центру, переворачивают его каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением в центре.

Капля должна висеть, не касаясь дна и краев лунки. Края лунки предварительно смазывают вазелином, что создает герметичность во влажной камере, что допускает долговременность препарата и возможность наблюдения. Вместо воды можно использовать питательную жидкую среду.

Задание на дом: Подготовить тему «Рост и размножение бактерий». Подготовиться к теме III (смотреть задания темы III).

Самостоятельная работа

Рассмотрите клетки бактерий зубного налета или кариесных зон зубов. Определите тип клеток, рассмотрите их движение. Вспомните, какие структуры определяют движение этих клеток, в чем отличие такого типа движения от движения сенной палочки?

Кто впервые предложил способы чистки зубов?

Почему опасно для здоровья зубов неумеренное употребление сахаров? Как можно предотвратить разрушение зубов? Какие микробы и почему наиболее опасны для зубов человека? Как микроорганизм закрепляется на поверхности зуба?

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 27–37.
2. Лукомская К.А. «Микробиология с основами вирусологии». – М., 1987. – С. 28–31.
3. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М., 1987. – С. 23–25.

ТЕМА III. Цитохимические методы изучения клеток микроорганизмов. Дифференциальные способы окраски клеток прокариот. Рост и размножение микроорганизмов

Материал и оборудование: предметные стекла, кристаллизаторы, спиртовки, бактериальные петли, вода дистиллированная (в пробирках), колбы с водой, красители, культуры микроорганизмов, микроскопы, объективы иммерсионные, плакаты, видеоустановка.

Цели занятия и задания:

1. Используя знания о структурной организации клеток прокариот, выяснить сущность и причины дифференциации клеток по методу Грама.
2. Научиться использовать методику окраски «по Граму», отработать технику микроскопирования с иммерсионным объективом.
3. Изучить тему «Рост и размножение микроорганизмов».

Задание III. 1. Повторить структуру и химический состав оболочек клеток грациликутных и фирмикутных бактерий. Зарисовать в тетради схемы строения оболочек прокариот, указав вещества оболочек.

Задание III.2. Запишите суть метода окраски клеток прокариот по Граму, сделайте вывод о причинах различной окраски клеток Г+ и Г-. Запишите методику окраски «по Граму».

Задание III.3. На предметном стекле выполните два мазка и окрасьте их «по Грамму». Рассмотрите их после окраски с помощью иммерсионного объектива и укажите тип клеток по Граму. Увиденное зарисуйте, указав увеличение, тип клеток по морфологии и расположению, окраску клеток. Сделайте вывод о причинах этого явления.

Задание III.4. Изучите тему «Размножение и рост микроорганизмов».

Подготовьте ответы на контрольные вопросы и вопросы для самоконтроля.

Контрольные вопросы

1. Как размножаются грациликутные и фирмикутные микроорганизмы.
2. Что такое диморфный и полиморфный клеточный цикл?
3. Какие фазы роста популяции м/ов в статической культуре?
4. Что такое непрерывные культуры; в чем различия выращивания в хемостатах и турбидостатах?
5. Какое значение имеет непрерывное культивирование?
6. В чем отличие оболочек Г+ и Г- бактерий?

Вопросы для самоконтроля

1. Что определяет способность клеток удерживать комплекс красителей «по Грамму»?
2. Составьте таблицу наличия у Г+ и Г- прокариот семи (7) основных компонентов.

3. Что такое урожай или выход?
4. Что такое время генерации?
5. Назовите крупнейшие производства на основе непрерывных культур микроорганизмов.

Информационный материал

1. Клеточная стенка, ее функции, строение.

Клеточная стенка – важный и обязательный структурный элемент прокариотной клетки (исключение – микоплазмы и L-формы). На долю кл.ст. – от 5 до 50% сухих веществ клетки. Клеточная стенка служит механическим барьером между протоплазмой и внешней средой; придает клеткам определенную форму; определяет способность удерживания протоплазмой или вымывание красителей; дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах.

Разнообразные функции выполняют макромолекулы, локализованные частично или полностью на внешней стороне клеточной стенки:

- специфическая рецепторная деятельность для фагов и колицинов;
- антигенная роль (ЛПС-Г-; тейхоевой к-ты -Г+);
- межклеточное взаимодействие при конъюгации бактерий, а также при взаимодействии между патогенными бактериями и тканями высших органов.

Клеточная стенка Г (Грациликутных) –значительно расширила круг функций:

- осуществляет функции дополнительного клеточного барьера, имеет специфические и неспецифические каналы (диффузные поры);
- препятствует проникновению в клетку токсических в-в (что определяет более высокую устойчивость Г- (Грациликутных).

2. *Строение клеточных оболочек у некоторых групп прокариот.* У радиоустойчивых видов эубактерий, выделенных из мяса после воздействия на него высокой дозой у-излучений, рода *Deinococcus radiodurans*. У *Deinococcus* обнаружен особый тип оболочек. Клетки образуют тетрады, покрытые муреином, а остальные слои оболочки общие для тетрады. Окрашиваются по Г+, но структура ближе к Г-. Вид считается эволюционно очень древним.

Муреиновый слой имеет перфорации – поры. Слой тонкий (8–20 нм). Над муреином расположен слой, состоящий из множества участков (компарментов). Затем идет мембранный слой, богатый липидами, липопротеином (без ЛПС) – аналог внешней мембраны грациликутных. Затем выявлено пространство, прозрачное для электронов, а далее слой химически устойчивых белков (гидрофобные, при 30° не разрушаются 8М мочевиной, 1 М NaOH, 1 М МЭДТУ и др.).

Оболочки архебактерий очень разнообразны, окрашиваются и Г+ и Г-, построение имеют особое.

Метанообразующие бактерии колониального типа имеют общий чехол для многоклеточной нити. Чехол состоит из белка, образующего овальные субъединицы. Между клетками располагаются пространства (спейсеры), по которым может происходить разделение нити. Каждая клетка в колонии имеет и собственную оболочку.

Оболочки галофильных бактерий не содержат муреина, у некоторых образована сульфатированным гетерополисахаридом или гликопротеином.

Муреин у архебактерий необычен по химическому составу (псевдомуреин). Архебактерий, имеющие муреин окрашиваются «по Грамму» положительно.

Задание на дом

Подготовиться к изучению темы IV. Повторить строение клетки прокариот. Смотреть задание и литературу темы IV.

Самостоятельная работа

Окрасьте методом Грама клетки исследуемой культуры. Определите тип клеток и морфологические особенности.

Проведите исследование клеток культур микрофлоры воздуха, воды.

Определите тинкториальные свойства клеток и объясните их причины. Какие способы окрашивания используют для кислотоустойчивых бактерий и почему?

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 27–41.
2. Лукомская К.А. «Микробиология с основами вирусологии». – М., 1987.
3. Громов Б.В. Строение бактерий. – Л., 1985. – С. 14–72.
4. Теппер Е.З. и др. «Практикум по микробиологии». – М., 1984. – С. 23–27.

ТЕМА IV. Цитохимические методы изучения клеток микроорганизмов; методы выявления эндоспор и капсул

Материал и оборудование: культуры спорообразующих микроорганизмов; культуры рода *Azotobacter* на чашках Петри, в остальном оборудование то же, что на занятии по теме III, плакаты, видеоустановка.

Цели занятия:

1. Изучить биологическое значение, строение спор и основные этапы и способы спорообразования у спорообразующих бактерий.
2. Выяснить структуру и химический состав капсул, биологический смысл капсулообразования, функции слизистых образований.
3. Научиться использовать методы выявления спор и капсул и отработать технику приготовления препаратов.

Задание IV.1. Изучите основные этапы спорообразования и типы расположения спор в материнской клетке, а также биологический смысл процесса. Зарисуйте в тетрадь схему строения эндоспоры, типы спор, запишите основные этапы спорообразования, прорастания спор.

Задание IV.2. Научитесь использовать дифференциальные способы окраски клеток и эндоспор. Запишите методику выявления спор по Пешкову. Проведите окраску мазков по Пешкову; *рассмотрите с помощью иммерсионного объектива*, укажите отличие вегетативных клеток (розовых) и эндоспор (сине-фиолетовые). Укажите причины различий. Зарисуйте рисунок, укажите способ микроскопии и увеличение.

Задание IV.3. Изучите особенности строения и биологическое значение капсул. Запишите в тетрадь методики выявления капсул (по Бурри – негативный и позитивный с метиленовым синим). Проведите выявление капсул, используя колония почвенных бактерий р. *Azotobacter*. В чашках Петри найдите вокруг комочков почвы слизистые желто-бурые или коричневые скопления и бактериальной петлей приготовьте мазок из этой слизистой массы. Мазок окрасьте метиленовой синькой или приготовьте препарат по Бурри (используя тушь). Рассмотрите капсулы под микроскопом сначала на малом, а затем – на большом увеличении (*без иммерсии*) с сухими объективами. Обнаружьте крупные прозрачные (по Бурри) или голубые крупные образования (позитивное выявление) среди синих клеток почвенных бактерий. Внутри голубоватых капсул иногда видны сами вегетативные клетки по 2 или 3.

Контрольные вопросы

1. Что такое эндоспора, почему и как она образуется?
2. Как происходит прорастание спор?
3. Капсула, слои, чехлы.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие клетки образуют эндоспоры и почему?
2. Почему в неблагоприятных условиях лишь отдельные группы бактерий образуют эндоспоры?
3. Что такое дипикколины, какова их роль?
4. Что такое кортекс?
5. Каково значение капсул?

Информационный материал

Эндоспоры – особый тип покоящихся клеток фирмикутных, т.е. бактерий с Г+ типом оболочки. Эндоспоры формируются внутри материнской клетки – спорангия, при этом происходит как бы поглощение одной клетки другой.

Описано 15 родов, образующих эндоспоры. Эндоспора – стадия покоя и приспособление к перенесению неблагоприятных условий (при недостатке пищи, рН, t° , O_2). Формирование эндоспор генетически детерминировано, определяет комплекс генов – спорулон, всего 150–200 генов (*Bac. subtilis*).

В нормальных условиях гены споруллона блокированы, процесс эндоспорообразования вызывается дерепрессией (разблокировкой) генов.

Для начала спорообразования необходимо завершение репликации хромосомы. Процесс проходит в 6 стадий, продолжителен, от 8 часов у аэробных мезофильных бацилл.

Морфологически дифференцированные клетки зубактерий

Специализированные клетки	Представители зубактерий, у которых они обнаружены
Эндоспоры	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Sporosarcina</i> , некоторые актиномицеты
Экзоспоры	некоторые виды <i>Methylosinus</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , многие актиномицеты
Цисты	миксобактерии, скользящие бактерии, <i>Azotobacter</i> , <i>Bdellovibrio</i>
Бактероиды	клубеньковые бактерии
Гетероцисты, акинеты, бациллы, гормогонии	цианобактерии

Структуры цитоплазмы.

Рapidосомы – структуры цитоплазмы, напоминающие отростки фагов и молекулы колицинов. Они освобождаются при лизисе клетки. Кроме белков, возможно содержат РНК. Функции неясны.

Р-тела – округлые светопреломляющие включения из белковой тесноскрученной ленты, обнаружены у бактерий р. *Caedobacter* – симбионтов инфузорий-парамеций. При нагревании, воздействии фосфорвольфрамовой кислоты и других веществ – раскручиваются.

Раскручивание R тел обратимо или необратимо. Находятся свободно или расположены на поверхности белковой ленты. Формирование R-тел определяется вирусными или плазмидными генами.

Магнитосомы – в клетках бактерий, обладающих магнитотаксисом т.е. способностью плыть вдоль линий магнитного поля. МС – окруженные мембранные частицы Fe_3O_4 (приобретают форму куба со сторонами 40–50 нм и расположены цепочкой вдоль оси клетки).

Капсулы, слизистые слои, чехлы.

В результате биосинтеза ряда полимеров прокариотической клеткой может наблюдаться их отложение вокруг клеток в виде слизи.

Капсула (К) – слизистое образование, обволакивающее клетку, сохраняющее связь с клеточной стенкой и имеющее аморфное строение.

Если толщина капсулы до 0,2 мкм – микрокапсула (обнаруживается в электронном микроскопе).

Макрокапсула – 0,2 мкм (метод ее рассмотрения в каплях туши – негативное контрастирование) (рис. 1).

Слизистые слои – слизистые образования аморфного бесструктурного вида, легко отделяются от клетки.

Чехлы – имеют тонкую структуру, часто содержат в слоях дополнительные вещества (окислы Me). Возможны варианты переходных состояний.

Функции:

- защита от механических повреждений, высыхания;
- создание дополнительного осмотического барьера;
- препятствие для проникновения фагов;
- наличие капсулы сопряжено с высокой вирулентностью бактерий;
- капсулярная слизь – источник запасных питательных веществ;
- слизистые образования у некоторых видов способствуют объединению клеток в конгломераты (азотобактер);
- способствует закреплению бактерий на поверхности субстратов, передвижению;
- при старении клеток вещество капсул переходит в аморфный полисахарид. У *Zoogloea ramidra* – вещество капсул содержит вещество частиц ила.

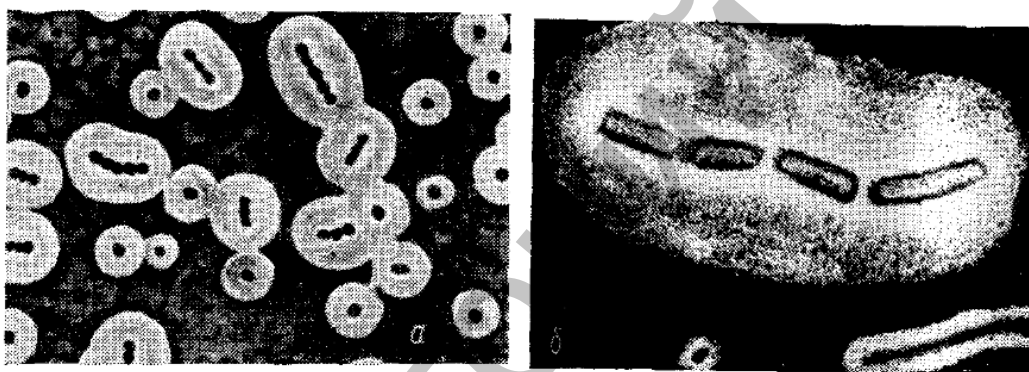


Рис. 1. Бактериальные капсулы. $\times 3750$:
а – кокков; б – бацилл.

Задание на дом: изучить вопросы строения клеток прокариот. Подготовить тему «Питание прокариот».

Самостоятельная работа.

Укажите условия, при которых сибиреязвенный микроб и пневмококки формируют хорошо выраженную капсулу.

Выясните, какие химические соединения являются основными компонентами капсул.

Метод Гинса-Бурри – один из методов выявления капсул. В чем его суть? Как обнаружить капсулы и сами клетки бактерий?

Какие способы окраски позволят обнаружить эндоспоры? Проведите выявление спор различными методами (методом Шеффера – Фултона и по Пешкову). Как различается окраска спор?

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 37–47.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – С. 3–37.
3. Громов Б.В. Строение бактерий. – Л., 1985. – С. 61–136.
4. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М., 1987. – С. 40–51.

ТЕМА V. Коллоквиум. Строение бактериальных оболочек и надоболочечных структур

Цели:

1. Изучить и закрепить знания о структурах оболочек бактерий и химическом составе компонентов оболочек.
2. Уяснить отличия в строении оболочек грациликотных и фирмикотных бактерий, других групп микроорганизмов.
3. Отметить роль структурных компонентов оболочек для организма бактерий и других живых организмов.
4. Обобщить знания, полученные на практических занятиях по теме.

Вопросы для подготовки и обсуждения

1. Свойства и отличительные черты микроорганизмов, сравнительная характеристика царства Procarvotaе.
2. Основные структуры прокариотной клетки. Функция клеточных оболочек и надоболочечных структур.
3. Химические вещества клеточной стенки бактерий, их строение и свойства.
4. Строение оболочек фирмикотных бактерий и функции оболочек.
5. Строение оболочек грациликотных бактерий – дополнительные и основные функции оболочек.
6. Строение оболочек (клеточных стенок) других групп бактерий (микобактерий, архебактерий, радиоустойчивых эубактерий). Отличия в структуре и химическом составе, свойствах.
7. Строение и функции капсул.
8. Жгутики: особенность строения, функция. Отличия структур жгутика фирмикотных и грациликотных бактерий. Типы клеток по расположению жгутиков.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое ДАП, какие производные вещества она обуславливает?
2. Какие вещества определяют высокую поглотительную способность оболочек фирмикотных?
3. Какова роль поверхностных белков-молекул у фирмикотных?
4. Какие свойства определяют миколовые кислоты микобактерий?
5. Выясните структуру внешней мембраны оболочки грациликотных.
6. Какова роль липополисахарида (ЛПС), каково его строение?
7. Как отражается структура ЛПС на культуральные свойства колоний?
8. Какова роль молекул белков-поринов и какие структуры они образуют?
9. Периплазматическое пространство, его строение и функции.
10. Что такое «спейсеры», протопласты, сферопласты, L-формы?

Задание на дом

Подготовиться к коллоквиуму «Строение бактериальной клетки. Организация цитоплазмы»

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 17–47.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – Гл. 1. – С. 12–36.
3. Громов Б.В. Строение бактерий. – Л., 1985. – Стр. 14–73, 116–130. – Главы 1, 2, 4, 6. – С. 155–172.
4. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1978. – Гл. 4. – С. 31–67.

ТЕМА VI. Коллоквиум. Строение бактериальной клетки. Организация цитоплазмы. Эндоспоры. Генетический аппарат

Цели:

1. Изучить и закрепить знания о структурах цитоплазмы бактерий.
2. Повторить строение и функции ЦПМ и ее производных.
3. Отметить структурные и функциональные особенности включений, нуклеоида.
4. Изучить запасные вещества бактерии; обобщить знания, полученные на лабораторных занятиях по теме.

Вопросы для подготовки и осуждения

1. Строение цитоплазматической мембраны: белки и липиды мембраны.
2. Квазикристаллическое и жидкое состояние ЦПМ. Транспортная функция ЦПМ.
3. Энергетическое обеспечение активного транспорта (согласно теории Митчелла).
4. Внутриклеточные мембранные системы: мезосомы, типы, функции.
5. Особенности ЦПМ архебактерий, функции ЦПМ.
6. Бактериальные рибосомы.
7. Структуры клетки, окруженные белковой мембраной.
8. Запасные вещества бактерий.
9. Полисахаридные включения бактерий.
10. Поли- β -оксимасляная кислота (ПОМ).
11. Нуклеоид: строение, функции.
12. Эндоспора: биологическое значение и строение. Образование спор и прорастание спор.

Вопросы для самоконтроля

1. Каким образом создается протондвижущая сила?
2. Что такое симпорт и антипорт?
3. Как можно обнаружить запасные вещества бактерий в их клетках?
4. Что такое аэросомы и карбоксисомы, какова их функция?

Запасные вещества прокариот

Запасное вещество	Структурные характеристики	Химический состав	Функции	Распространение
Гранулы гликогена (α -гранулы)	сферической формы, диаметр 20—100 нм	высокомолекулярные полимеры глюкозы	источник углерода и энергии	широко распространены тип запасных веществ
Гранулы поли- β -оксимасляной кислоты	диаметр 100—1000 нм; окружены однослойной белковой мембраной 2—3 нм толщиной	98 % полимера поли- β -оксимасляной кислоты, 2 % белка	источник углерода и энергии	широко распространены только у прокариот
Цианофициновые гранулы	размер и форма различны; могут достигать в диаметре 500 нм	полипептид, содержащий аргинин и аспарагиновую кислоту (1:1), мол. масса — $(25—100) \cdot 10^3$ Да	источник азота	обнаружены у многих видов цианобактерий
Гранулы полифосфата	диаметр приблизительно 500 нм, зависит от объекта и условий выращивания	линейные полимеры ортофосфата	источник фосфора и, возможно, энергии	распространенный тип запасных гранул
Гранулы серы	диаметр 100—800 нм; окружены мембраной	включения жидкой серы	донор электронов или источник энергии	пурпурные серобактерии, бесцветные бактерии, окисляющие H_2S
Углеводородные гранулы	диаметр 200—300 нм; окружены белковой оболочкой 2—4 нм толщиной	углеводороды того же типа, что и в среде	источник углерода и энергии	представители родов <i>Arthrobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> и другие прокариоты, использующие углеводороды

Задание на дом

Подготовиться к занятию по теме VII «Питание прокариот».

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Строение и жизнедеятельность микроорганизмов. – Витебск, 2002. – С. 5–37.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – Гл. 1.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1978. – С. 46–56.
4. Громов Б.В. Строение бактерий. – Л., 1985. – Гл. 3. – С. 73–115.
5. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии. – С. 20–51.

ТЕМА VII. Коллоквиум. Питание прокариот

Цели:

1. Изучить особенности питания микроорганизмов и выяснить типы питания и способы существования прокариотных микроорганизмов.
2. Выяснить принципиальные отличия бактериального фотосинтеза.

Вопросы для подготовки и осуждения

1. Химический состав прокариот.
2. Пищевые потребности прокариот. Факторы роста.
3. Источники биогенных элементов.
4. Механизм поступления питательных веществ через ЦПМ.
5. Пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт, перенос радикалов.
6. Типы питания прокариот.
7. Хемолитоавтотрофы.
8. Хемоорганавтотрофы.
9. Фотоорганотрофы.
10. Фотолитоавтотрофы.
11. Бактериальный фотосинтез, принципиальное отличие от фотосинтеза растений: пигменты, фотосинтетический аппарат и результаты фотосинтеза.

Информационный материал

I. ФЛАТ. Новые группы бактерий фотосинтетиков.

1. Гелиобактерии – строго анаэробные фототрофные бактерии с бактериохлорофиллом «д» и бескислородным типом фотосинтеза. Известны 2 вида, по составу клеточной оболочки Γ^+ , а красятся как Γ^- ; содержат немного каротиноидов, облигатные фототрофы, могут использовать в виде источника С – CO_2 и органические кислоты. Активные азотфиксаторы.

Есть предположение, что эта группа – предки плаستид бурых, диатомовых и золотистых водорослей (бактериохлорофилл. »д»-хлорофилл С содержат).

2. Прохлорофиты – открыты в 1975 г. Р. Левиным как группа возможных предшественников эукариотных зеленых водорослей или же предки хлоропластов. Для них характерно наличие хлорофилла b, а и каротиноидов (β -каротин, ксантофиллы) и др. Имеют защитные механизмы – защитная система супероксиддисмутаза FeMn – типа.

В 1986 г. в пресном озере найдена свободноживущая форма (известны симбионты с асцидиями).

3. Способность экстремально галофильных архебактерий осуществлять фотосинтез бесхлорофилльного типа была обнаружена в начале

70-х годов Д. Остерхельтом и В. Стокениусом, индентифицированными в ЦПМ *Halobacterium salinarum* комплекс белок+ретиаль-каротиноид-бактериородопсин, способный к светозависимому переносу H^+ - в через мембрану и к синтезу АТФ без Электронной Цепи Переноса – (ЦПЭ).

Галофильные археобактерии встречаются в средах с содержанием NaCl до 30% (Мертвое море, консервированные продукты). В клеточных оболочках их не обнаружен пептидогликан, а присутствуют гликопротеины или гетерополисахариды, толщиной – 15–20 – до 60 нм.

ЦПМ археобактерий– содержит уникальные липиды, в которых глицерин связан с C_{20} – терпеноидным спиртом – фитанолом. Содержит ЦПМ много бактериоруберина – каротиноидного пигмента, как средства защиты от избыточной радиации. Пигменты обеспечивают окраску бактерий от розовой до красной.

В различных состояниях бактериородопсин поглощает свет в длине волны 570 нм, или 412 нм. μH^+ достигает 200 мВ, а разрядка приводит к синтезу АТФ – так называемая «бактериородопсиновая протонная помпа».

Самостоятельная работа

Проанализируйте отличия фотопигментов у бактерий разных групп, укажите их отличия.

Какие группы бактерий были «пионерами» нашей планеты? Почему ваше предположение допустимо?

Какова роль кислородного фотосинтеза в истории Земли?

ЛИТЕРАТУРА.

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 63–69.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – Гл. 6. – С. 89–103.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1978. – С. 46–56.
4. Громов Б.В. Строение бактерий. – Л., 1985. – Гл. 3. – С. 73–115.
5. Ronald M. Atlas. Principles of Microbiologie. 1994.

ТЕМА VIII. Питание прокариот. Культивирование бактерий. Питательные среды и методы стерилизации

Цели и задачи:

1. Закрепить знания об особенностях питания микроорганизмов.
2. Выяснить основные условия культивирования различных групп бактерий.
3. Изучить типы питательных сред по консистенции, назначению и по составу компонентов.
4. Изучить методы стерилизации.

Оборудование: Сырой неочищенный картофель, ножи, мел, пробирки, пробки, водяная баня, стебли крапивы, нитки, колбы, плитки электрические, плакаты.

Задание VIII.1. Приготовить культуру картофельной палочки (одну пробирку на пару студентов).

Сырой неочищенный картофель нарезают тонкими длинными ломтиками и раскладывают в пробирки, в которые предварительно насыпают 0,5–1,0 грамм мела. Заливают на 2/3 водопроводной водой. Выдерживают на водяной бане при температуре 80°C 15–20 мин.

Почвенную взвесь 1:100 доводят до кипения и затем по 1 мл вносят в каждую пробирку.

Пробирки ставят в термостат при температуре 28–30°C. Количество пробирок по числу студентов.

Для накопительной культуры микроорганизмов рода *Clostridium*.

Задание VIII.2. Приготовить культуру пектин разрушающих бактерий.

Из стеблей крапивы готовят снопики (по 2–3 стебля) и перевязывают ниткой в 2-х местах, длина снопика 3–4 см.

Снопики помещают в колбу, заливают водопроводной водой и кипятят 1–2 мин. Воду сливают и снова кипятят. Затем раскладывают снопики в пробирки, заливают на 2/3 объема водой, добавляют небольшое количество мела.

В каждую пробирку вносят по 1 мл почвенной взвеси (1:100), предварительно доведя ее до кипения.

Пробирки помещают в термостат при температуре 28–30°C.

Накопительная культура пектин разрушающих бактерий готовится от 4–5 суток до 1–2 недели.

Задание VIII.3. Запишите основные среды.

СРЕДА ГЕТЧИНСОНА

1. Калий фосфорнокислый – K_2HPO_4 – 0,5 г.
2. Кальций хлористый – $CaCl_2$ – 0,05 г.
3. Магний сернокислый – $MgSO_4$ – 0,15 г.
4. Натрий хлористый – $NaCl$ – 0,05 г.
5. Хлористое железо – $FeCl$ – следы
6. Натрий азотнокислый – $NaNO_3$ – 1,3 г
7. Вода дистиллированная – H_2O – 500 мл

К среде добавляют немного мела, помещают складчатый фильтр и засевают небольшим количеством почвы.

Выделение и накопление целлюлозоразрушающих бактерий методом посева комочков почвы (аэробные) – 8–10 суток.

СРЕДА ВИНОГРАДСКОГО

1. Глюкоза – 10 г
 2. K_2HPO_4 – 0,5 г
 3. $MgSO_4$ – 0,25 г
 4. NaCl – следы
 5. $MnSO_4$ – следы
 6. $Fe SO_4$ – следы
 7. $CaCO_3$ – 10 г
 8. Вода дистиллированная – 0,5 л
- Анаэробные азотфиксаторы.

СРЕДА ГИЛЬТАЯ

- 1 р-р: 1. Вода дистиллированная – 63 мл
2. KNO_3 – 0,5 г
3. Аспарагин – 0,25 г
- 2 р-р: 1. Вода дистиллированная – 125 мл
2. Лимоннокислый натрий – 1,25 г
3. KH_2PO_4 – 0,5 г
4. $MgSO_4$ – 0,5 г
5. $CaCl_2$ – 0,5 г
6. $FeCl_3$ – следы

Растворы сливают вместе и доводят до 250 мл. Разливают в пробирки высоким столбиком. Для выявления денитрофицирующих бактерий.

СРЕДА ВИНОГРАДСКОГО

Для второй фазы: г/л дист. воды

1. $NaNO_2$ – 1,0 г/л
2. Na_2SO_4 – 1,0 г/л
3. NaCl – 0,5 г
4. K_2HPO_4 – 0,5 г
5. $MgSO_4$ – 0,5 г
6. $Fe SO_4$ – 0,4 г

Для нитратных бактерий.

СРЕДА ЭШБИ

1. Сахароза – 10 г
 2. Манит – 5 г
 3. K_2HPO_4 – 0,1 г
 4. $MgSO_4$ – 0,1 г
 5. NaCl – 0,1 г
 6. K_2SO_4 – 0,05 г
 7. $CaCO_3$ – 2,5 г
 8. Агар – 10 г
 9. Вода дистиллированная – 0,5 л
- Для азотобактера и олигонитрофильных м/о (дрожжи р. Candida).

СРЕДА ВИНОГРАДСКОГО – 2

1. Вода дистиллированная – 250 мл
2. $(H_4)_2O_4$ – 0,5 г
3. K_2HPO_4 – 0,25 г
4. $MgSO_4$ – 0,125 г
5. NaCl – 0,5 г
6. $Fe SO_4$ – 0,1 г
7. $CaCO_3$ или $MgSO_4$ – 0,25 г

Разлить в плоскодонные колбы тонким слоем. В каждую добавить мел по 0,5 г. Для накопительной культуры нитрозных бактерий (1 фаза нитрификации).

Задание VIII.3. Записать питательные среды, указать, для каких групп микроорганизмов среда используется, сделав пояснение. Дать краткую характеристику этих групп микроорганизмов.

Задание VIII.4. Записать основные методы стерилизации.

Контрольные вопросы

1. Каким условиям должна отвечать питательная среда?
2. Какие бывают питательные среды по составу, по назначению, по консистенции?
3. Назовите методы стерилизации. Что такое стерилизация?
4. Какие способы холодной стерилизации бывают?

Вопросы для самоконтроля.

1. Как «уплотнить» среду?
2. Что такое элективная среда?
3. Что такое фламбирование, пастеризация, тиндализация?
4. Когда применяются мелкопористые фильтры?

Информационный материал

1. Культивирование микроорганизмов, условия культивирования

Для изучения свойств микроорганизмов, для получения биомассы необходимо размножить их в условиях лаборатории. Культивирование, или выращивание, микробов возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Большинство бактерий, дрожжи, плесени и часть простейших культивируют на искусственных питательных средах. Вирусы, риккетсии и некоторые простейшие способны размножаться только в живых клетках, культуре тканей, курином эмбрионе или организме животного.

Искусственные питательные среды, применяющиеся для культивирования микроорганизмов, должны соответствовать определенным требованиям: содержать все питательные вещества – белки, углеводы, жиры, вещества необходимые для роста и размножения микробов. Источником азота могут быть различные органические и неорганические соединения, источником углевода – углеводы, спирты, определенные кислоты. Для культивирования некоторых микроорганизмов необходимо добавление жиров, парафина, воска. Большинство гетеротрофов, особенно патогенных, культивируют в средах, содержащих кровь, сыворотку, сложные органические вещества, витамины, ионы металлов.

Осмотические условия, необходимые для жизни микробов, создают в питательной среде добавлением хлорида натрия или определенным сочетанием солей фосфата натрия и фосфата калия. Для большинства микробов изотонична питательная среда, содержащая 0,5% хлорида натрия. При повышенном содержании солей наблюдаются явления **плазмолиза**, когда клетка отдает воду, сморщивается и погибает. При пониженном содержании соли, наоборот, отмечают явления плазмолиза: клетка набухает, впитывая в себя воду, и лопается.

Определенная реакция среды – водородный показатель, который оп-

ределяется соотношением водородных (H^+) и гидроксильных (OH^-) ионов, является неперменным условием успешного культивирования микробов. Водородный показатель обозначается символом рН. Он представляет собой логарифм числа абсолютной концентрации водородных ионов в среде, взятый с обратным знаком. В принятом обозначении рН нейтральной реакции соответствует 7,0. В этом случае число водородных ионов равно числу гидроксильных. Показатель ниже 7,0 указывает на кислую реакцию, а выше 7,0 – на щелочную. Большинство патогенных микроорганизмов успешно культивируется при слабощелочной реакции питательных сред, равной 7,2–7,4. Однако холерный вибрион растет при рН 7,8–8,5, а для культивирования дрожжей и плесеней необходима кислая среда рН 5,0–5,5.

Питательные среды должны содержать также достаточное количество воды, быть по возможности прозрачными и обязательно стерильными, т.е. до посева не содержать микроорганизмов.

Температура выращивания должна быть оптимальной для данного вида микроорганизма. Большинство возбудителей инфекционных заболеваний размножается при $37^{\circ}C$. Однако для отдельных видов оптимальная температура культивирования несколько ниже: для возбудителей чумной палочки $28^{\circ}C$, для спирохет и некоторых простейших (лейшманий) $28-29^{\circ}C$. Грибы можно выращивать и при более низких температурах. Выращивание микроорганизмов на питательных средах производят в специальных аппаратах-термостатах, в которых устанавливают и поддерживают необходимую оптимальную температуру.

Питательные среды. Культивирование бактерий производят на искусственных питательных средах, для приготовления которых могут быть использованы различные естественные продукты: молоко, кровь, сыворотка, картофель, желток куриного яйца, мясо и др. Искусственные питательные среды различаются по составу, консистенции, назначению.

По составу эти среды могут быть простые: пептонная вода, мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный желатин (МПЖ) и сложные. Сложные среды готовят путем прибавления к простым крови, астина, сыворотки.

Синтетические среды готовят из простых химических соединений, взятых в определенных сочетаниях. Их используют обычно для изучения деталей обмена веществ у микробов или для получения свободных от посторонних веществ продуктов жизнедеятельности микробных культур.

По консистенции питательные среды могут быть плотными, что достигается добавлением к жидким средам 2–2,6% агар-агара, представляющего собой полисахарид, содержащийся в морских водорослях. Плотные среды можно получить и при добавлении 2–3% желатина.

Полужидкие среды готовят с добавлением 0,8–1,2% агар-агара. Широко применяются жидкие питательные среды.

По назначению питательные среды могут быть дифференциальными, элективными и индикаторными.

Дифференциальные среды позволяют отличать виды микробов друг от друга. Их широко используют при микробиологической диагностике инфекционных заболеваний. Плотные дифференциально-диагностические среды Эндо, Левина, Плоскирева применяются для дифференциации кишечной палочки от патогенных микробов семейства кишечных: возбудителей дизентерии, брюшного тифа и паратифов. Принцип их изготовления заключается в добавлении к мясо-пептонному агару лактозы и различных индикаторов, выявляющих в среде кислые продукты. Кишечная палочка, расщепляющая лактозу, образует окрашенные индикатором колонии: при использовании фуксина они красного цвета, а эозинметиленового синего. Патогенные кишечные микробы, не разлагающие лактозу, растут в виде бесцветных колоний. Для изучения ферментативных, сахаролитических свойств микробов широко используются также жидкие или полужидкие питательные дифференциальные среды Гисса. Они состоят из пептонной воды, для полужидких – добавляют 0,5% агара, 0,3–1% какого-либо углевода (лактоза, глюкоза, мальтоза и пр.) и индикатора. В качестве индикатора используют кислый фуксин, обесцвеченный едким натром (индикатор Андреде), бромтимолблау и др. При образовании кислых продуктов обмена в результате расщепления углеводов среда с индикатором Андреде из желтоватой становится красной, а бромтимолблау меняет цвет морской волны на желтый.

Для получения протеолитических свойств микробов применяют среды, содержащие белки или продукты их расщепления (пептон), например, среды с желатином или мясо-пептонный бульон. По образованию конечных продуктов расщепления белков (индол, сероводород, аммиак) или разжижению желатина судят о наличии соответствующих ферментов.

Элективные среды обычно применяют для выделения микробов определенных видов из исследуемого материала, содержащего разнообразную постороннюю микрофлору. В элективных средах создаются благоприятные условия для жизнедеятельности только определенного вида микроба. Например, элективной средой холерного вибриона служит щелочной агар или щелочная пептонная вода, в которой другие микроорганизмы не размножаются.

Возбудители брюшного тифа и паратифов выращивают на среде Мюллера, так как эти бактерии менее чувствительны к соединениям тетраэтионата натрия, чем кишечная палочка. Возбудители дифтерии культивируются на свернутой сыворотке Леффлера, поскольку они размножаются на этой среде быстрее, чем сопутствующая микрофлора зева.

Индикаторные среды используются для выявления культур микробов, рост которых вызывает хорошо видимые внешние изменения среды, позволяющие судить о присутствии микробов. Например, анаэробы на среде Вильсона-Блера (висмут-сульфит-агар) восстанавливают сернистый натрий. При его соединении с хлорным железом образуется сернистое железо, окрашивающее колонии в черный цвет.

В настоящее время многие питательные среды выпускают в виде готовых сухих сред-полуфабрикатов, содержащих все необходимые для жизнедеятельности микробов ингредиенты. Среда из сухого порошка готовят путем добавления воды и кипячения. При необходимости их подвергают стерилизации.

Методы стерилизации.

Стерилизация или обеспложивание – процесс уничтожения живых микроорганизмов и спор микроорганизмов на поверхности или внутри объекта. Выделяют термическую и холодную стерилизацию.

Термическая стерилизация включает:

- прокаливание и обжигание огнем (фламбирование);
- кипячение;
- стерилизацию горячим сухим паром;
- стерилизацию в автоклаве насыщенным паром под давлением;
- тиндализацию или дробную стерилизацию;
- пастеризацию.

Холодная стерилизация использует факторы физические (УФЛ), химические вещества.

Стерилизация фильтрованием предполагает пропускание веществ через бактериальные фильтры (глубинные или мембранные).

Эффективность стерилизации доказывает гибель спор микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Строение и жизнедеятельность микроорганизмов. – Витебск, 2002. – С. 54–58.
2. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 63–69.
3. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – Гл. 6. – С. 89–103.
4. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – С. 20, 23, 55–64.

ТЕМА IX. Принципы современной классификации микроорганизмов. Идентификация и классификация микроорганизмов по культурным признакам

Цели и задачи:

1. Выяснить основные принципы современной классификации микроорганизмов и изучить характеристики основных групп бактерий.
2. Научиться определять по культурным признакам и морфологиче-

ским характеристикам род бактерий.

3. Изучить отличительные признаки наиболее важных физиологических групп.

Оборудование: Чашки Петри с выросшими колониями; наборы для микробиологического исследования; петли, реактивы, вода стерильная и водопроводная, плакаты по теме: «Культурные признаки микроорганизмов».

Задание IX.1. Исследовать культуру картофельной палочки и крапивных снопиков. Изучить характер роста бактериальной культуры, характер развития пленки (тонкая, сухая, складчатая, слизистая), отметить цвет пленки, определить наличие мути (слабая, умеренная, сильная); зафиксировать и указать присутствие и характер осадка (обильный, плотный, хлопьевидный), цвет осадка.

Задание IX.2. Изучить культурные признаки колоний на плотных средах (записать и зарисовать в тетради) (рис. 2–4).

На предложенном для описания образце определить размеры колоний: крупная – Д 10 мм, средняя – Д от 1 до 10 мм, 1 мм – точечная (мельчайшая).

Указать оптимальные свойства (прозрачность, просвечиваемость, непрозрачность, блестящая, матовая, флуоресцирующая).

Определить край колонии: (гладкий, волнистый, зубчатый, лопастной, реснитчатый, ворсистый, ветвистый).

Описать поверхность колонии: (гладкая, шероховатая, складчатая, бугристая).

Определить форму колоний: (круглая, круглая с фестончатым краем, круглая с валиком по краю, с ризоидным краем, амёбовидная, нитевидная, складчатая, неправильная, концентрическая, сложная).

Отметить профиль колоний, записать и зарисовать (изогнутый, кратеровидный, бугристый, вырастающий в агар, плоский, выпуклый, каплевидный, конусовидный).

Определить цвет колоний (грязно-белый, белый, желтый, оранжевый, сиреневый, синий, красный, черный и т.д.).

Охарактеризовать структуру: однородная, мелко-крупнозернистая, пленчатая, вырастающая в агар, легко снимающаяся иглой с агара.

Отметить консистенцию: (маслянистая, тестообразная, слизистая, плотная, вырастающая в агар, кожистая, рыхлая).

Для актиномицетов отметить пигмент и окраску воздушного субстрата, его консистенцию, поверхность, мицелиальный ободок, запах колонии (землистый, эфирный, фруктовый и т.д.).

Результаты изучения записать.

Задание IX.3. Приготовить фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов данной колонии и описать его морфологические признаки (по указанию преподавателя).

1. Форма клеток.
2. Величина.
3. Взаимное расположение.
4. Наличие или отсутствие спор и капсул.
5. Отношение к анилиновым красителям.
6. Окраска по Граму.

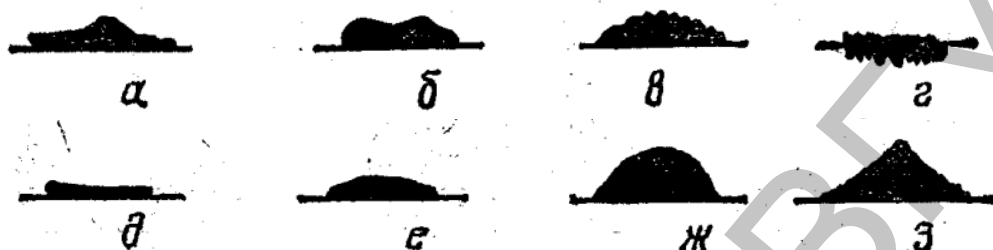


Рис. 2. Профиль колонии:

а — изогнутый, б — кратеровидный, в — бугристый, г — врастающий в агар, д — плоский, е — выпуклый, ж — каплевидный, з — конусовидный.

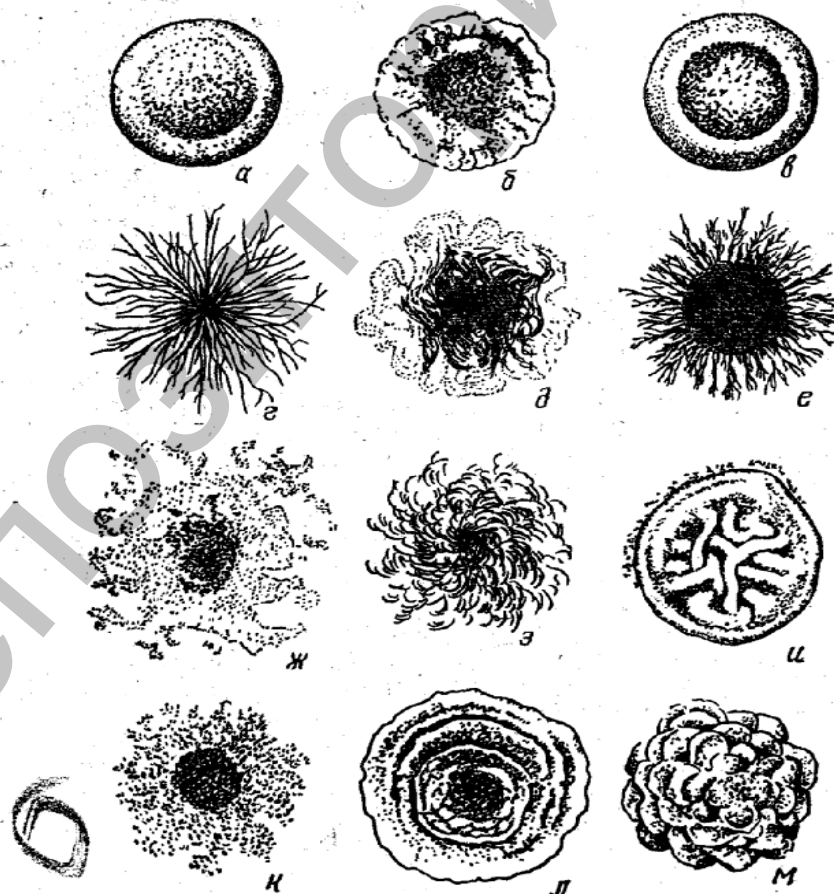


Рис. 3. Форма колоний:

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.

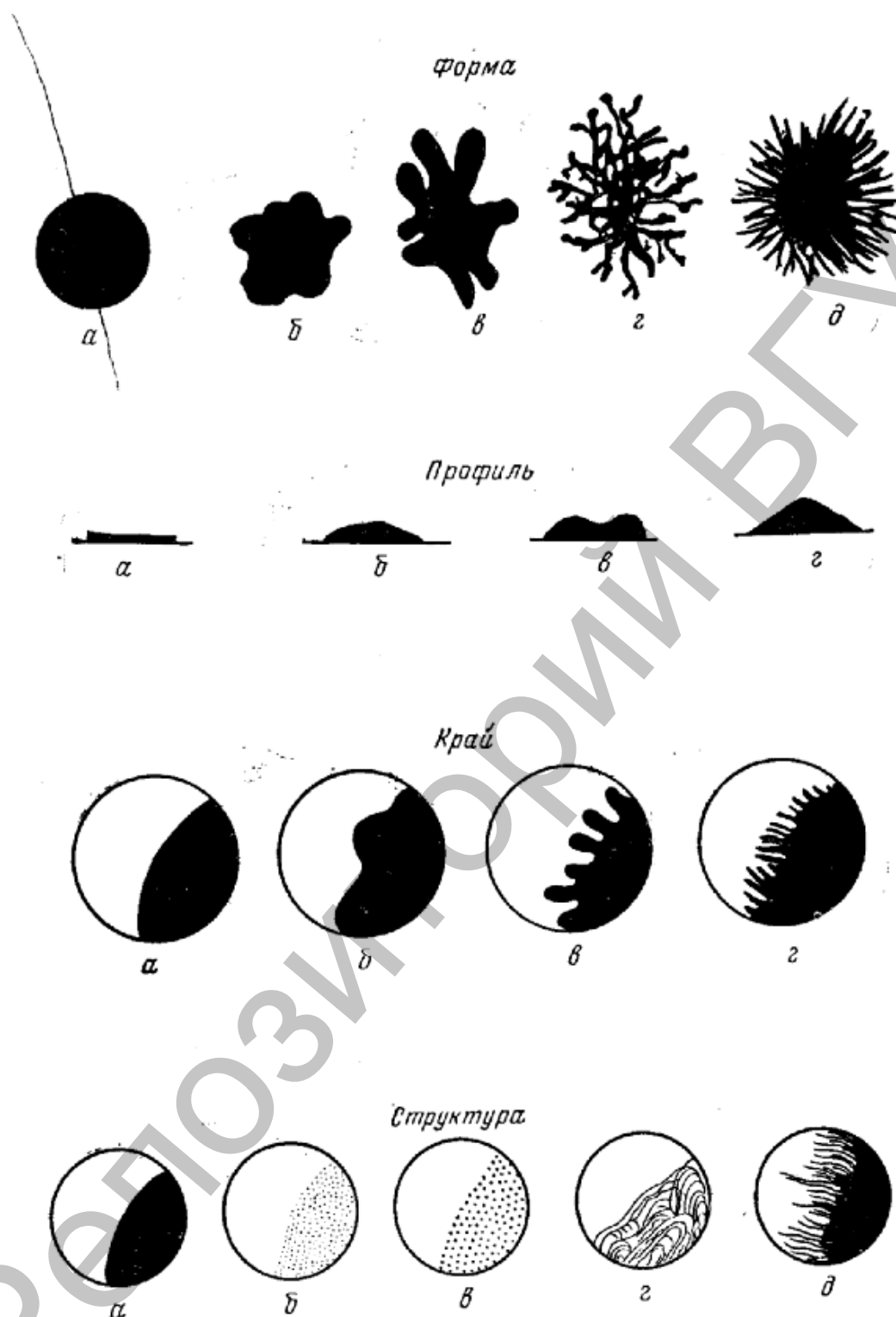


Рис.4. Характеристика колоний:
 Форма колоний: а — округлая, б — неправильной формы, в — амёбовидная, г — ризоидная, д — мицелиальная;
 Профиль колоний: а — плоский, б — выпуклый, в — кратерообразный, г — конусовидный;
 Край колоний: а — ровный, б — волнистый, в — лопастной, г — бахромчатый;
 Структура колоний: а — однородная, б — мелкозернистая, в — крупнозернистая, г — струйчатая, д — волокнистая

Вопросы для самоконтроля.

1. Что такое геносистематика, каков ее вклад в современную классификацию бактерий?
2. Что такое клон, штамм, вид?
3. Каковы особенности роста микроорганизмов на плотных средах?
4. Какие основные группы м/о выделяют и почему?

Самостоятельная работа. Заполните таблицу.

Таблица

Характеристика морфологических и тинкториальных особенностей микроорганизмов

Вид микроорганизма	Окраска «по Гرامу»	Кислотоустой- чивость	Наличие			Подвижность	Форма и распо- ложение клеток
			эндоспор	капсул	запасных ве- ществ		
Echerichia coli							
Staphilococcus aureus							
Pseudomonas aeruginosa							
Klebsiella pneumoniae							
Erwinia carotovora							
Bacillus subtilis							
Sarcina lutea							
Mycobacterium rubrum							
Streptococcus lactis							
Neisseria gonorrhoeae							
Rhizobium metiloti							
Azotobacter vinelandii							
Saccharomyces cerevisia							

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – Гл. 2. – С. 37–54.
3. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – Гл. 3. – С. 27–40. – Гл. 6. – С. 75–89.
4. Ronald M. Atlas WCB., 1993. Principles of Microbiologie. 1994.
5. Zansing M. Prescott ets. Microbiology.

ТЕМА X. Микрофлора воздуха, воды, почвы

Цели и задачи темы:

1. Выяснить количественную характеристику санитарного состояния воздуха и вспомогательных помещений.
2. Изучить роль микроорганизмов в воздухе.
3. Изучить роль микроорганизмов воды, санитарные показатели питьевой воды и систему водоочистки.
4. Уяснить структуру микробоценоза почвы, численность и динамику микроорганизмов в почвах нашего региона.

Оборудование: Чашки Петри, с результатами опытов по количественному учету микроорганизмов в воде, воздухе, почве; миллиметровая бумага, микроскопы, наборы для микробиологических исследований (см. ранее), плакаты, видеоустановка.

Задание X.1. Количественный учет бактерий в водопроводной воде.

В качестве питательной среды используют стерильный МПА. Для исследования в стерильные колбочки или пробирки берут водопроводную воду из открытого водоема в объеме 5 – 10 мл и закрывают их стерильными ватными пробками. Пробы воды хранят при температуре не выше 4⁰С и не более 3 час. Для количественного учета необходимого исследуемую воду (загрязненную) развести.

Воду из артезианских колодцев и водопровода можно использовать без разведения. Воду открытых водоемов следует разводить не менее, чем 1:1000.

1 мл воды из пробирки последнего разведения выливают на дно стерильной чашки Петри, сверху заливают расплавленной питательной средой, температура которой не должна превышать 45⁰С. Чашки закрывают и осторожным покачиванием воду с питательной средой равномерно распределяют по дну чашки. Через 3–5 суток развившиеся в чашки Петри колонии подсчитывают и определяют количество бактерий в 1 мл воды (среднее количество колоний умножают на разведение).

Определение коли-титра. Коли-титр – наименьшее количество воды (мл), в котором обнаруживается хотя бы одна кишечная палочка. Наличие кишечной палочки в воде указывает на загрязнение ее содержимым желудочно-кишечного тракта. В отличие от других микроорганизмов воды, кишечная палочка может развиваться при температуре 43–46°C, легко сбраживает углерод с образованием кислоты и газа. Это свойство микроба положено в основу определения коли-титра. Существует несколько методов определения коли-титра.

Определение коли-титра на среде Эйкмана.

Исследуемую воду высевают на среду Эйкмана (пептон 1 г, натрия хлорид 0,5 г, глюкоза 0,5 г, водопроводная вода 100мл, pH 7,4–7,6). При необходимости готовят концентрированную среду, для этого количество вещества, кроме воды, увеличивают в 10 раз. Глюкозу можно заменить лактозой или маннитом. Водопроводную воду, в зависимости от численности людей в населенном пункте, сеют:

а) в городах до 1 млн. человек в объеме 300 мл: два объема по 100 мл и десять объемов по 10 мл;

б) в городах свыше 1 млн. человек в объеме 500 мл: четыре объема по 100 мл и десять объемов по 10 мл.

Чистую воду открытых водоемов сеют в количестве 100, 10 и 0,1 мл (1 мл воды, разведенной 10^{-1}) загрязненную – 10, 1 и по 1 мл воды, разведенной 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и т.д. Посевы помещают в термостат при температуре 43°C и выдерживают в течение суток.

Через 7–12 ч пробирки на время вынимают из термостата и делают посев в розовый дифференцированный агар (РДА). На РДА выращивают при 37°C, и если имеется кишечная палочка, то через 7–12 ч среда желтеет, разрывается. Среда Эйкмана к этому времени (24 ч) мутнеет, образуется газ. При необходимости проводится идентификация *E.coli*.

Состав РДА. МПА (pH 7,4–7,6) 100 мл, желчи 5 мл, лактозы 1 г, глюкозы 0,1 г, 1%-ного спиртового раствора розоловой кислоты по 0,2 мл. Среду разливают по 3–4 мл в пробирки и стерилизуют в течение 15–20 мин при температуре 112°C. Часть среды скашивают, так как посев делают уколом и на скошенную поверхность.

Определение коли-титра по методу Булижа.

Среду Булижа готовят по следующей прописи: к 1 л мясопептонного бульона добавляют 12,5 г маннита и 6 мл 1%-ного раствора нейтрального красного. Среду разливают в колбы и пробирки с «газовками» и дробно стерилизуют. Среда вишнево-красного цвета, ее засевают исследуемой водой в следующих соотношениях, мл:

Исследуемая вода	100	50	25	10	5	1	0,1
Питательная среда	50	25	12,5	5	2,5	3	2,5
Стерильная вода	—	—	—	—	—	5	5

Посевы помещают в термостат на сутки при температуре 43°С. Рост сапрофитной микрофлоры при этой температуре подавляется. При наличии кишечной палочки она сбрасывает маннит, индикатор (нейтральный красный) редуцируется, и среда принимает соломенно-желтое окрашивание, мутнеет, в «газовках» появляется воздух.

Для того чтобы убедиться, что изменения произведены кишечной палочкой, из пожелтевшей среды делают посев на среду Эндо. Посевы на среде Эндо помещают в термостат (37°С) на сутки. Появление красных с металлическим блеском колоний, обнаружение при микроскопии граммотрицательных палочек и соответствующих изменений на цветном ряду подтверждают наличие кишечной палочки.

Определение коли-индекса методом мембранных фильтров.

Мембранные фильтры, употребляемые при исследовании воды, имеют различную проницаемость и разные номера. Наиболее часто применяют фильтр – N 3. Фабричные фильтры дважды кипятят в дистиллированной воде в химическом стакане. Затем приготовленные бумажные фильтры накладывают матовой поверхностью вверх на препарат и ставят в термостат при температуре 37°С или лучше при 43°С на сутки. На белой поверхности фильтров при наличии кишечной палочки появляются красные колонии, которые и подсчитывают. Методом мембранных фильтров определяют коли-индекс, то есть количество кишечных палочек, содержащихся в 1 л воды. Для перевода коли-титра в коли-индекс необходимо 1000 разделить на число, показывающее коли-титр. Для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Пример. При коли-титре, равном 10, коли-индекс равен 100. При коли-индексе, равном 5, коли-титр равен 200.

Санитарная оценка воды.

Согласно ГОСТ на питьевую воду, общее количество микробов (микробное число) в 1 мл при посеве неразведенной водой и выдерживании ее в течение 24 ч при 37°С должна быть не более 100. В 1 л воды при определении методом мембранных фильтров кишечных палочек должно быть не более трех. При использовании бродильных проб титр кишечной палочки должен быть не более 300. К водопроводной воде в городах с населением свыше 1 млн. человек должны предъявляться более высокие требования.

Вода открытых водоемов считается хорошей при коли-титре 100, коли-индексе 10. При коли-титре ниже 1 вода непригодна к употреблению. Следовательно, чем выше коли-титр, тем вода чище, лучше, и наоборот, чем ниже, тем качество ее хуже.

Для демонстрации плохой и хорошей воды открытых водоемов ее высевают на среду Булижа: в первый ряд – с коли-титром 100 и выше (вода хорошая); во второй с коли-титром 0,1 и ниже (вода плохая). По изменению окрашивания среды (от малинового-красного до желтой) можно уста-

новить наличие кишечной палочки в определенном объеме исследуемой воды и ее качество.

Подсчет колоний в чашках Петри. На мясопептонном агаре в чашках Петри подсчитывают выросшие колонии из разведений 10^{-2} , 10^{-1} и неразведенной воды. После подсчета колоний получаемый результат умножают на разведение и определяют среднее число. Качество воды оценивают по содержанию микробов в 1 мл:

Хорошая вода.....	до 100
Сомнительная вода.....	от 100 до 500
Плохая вода.....	от 500 и более

Санитарное состояние воздуха.

Содержание микроорганизмов в воздухе разных комнат определяют путем подсчета колоний на всей поверхности питательной среды чашки. В зависимости от количества выросших колоний делают заключение о микробной загрязненности воздуха в помещении.

Содержание микроорганизмов в 1 л, а затем в 1 м^3 воздуха (при отборе проб прибором Кротова) определяют следующим образом: число выросших колоний делят на число прошедшего воздуха и умножают на 1000.

Пример. Через радиальную щель крышки узла отбора проб за 1 мин проходит 37 л воздуха, за 3 мин – 111 л. При наличии в чашке на среде 222 колоний в 1 л воздуха содержится две живые микробные клетки, а в 1 м^3 – 2000.

Чистым воздух считается в том случае, если в 1 м^3 летом содержится 1500, а зимой – 4500 микроорганизмов; в загрязненном воздухе соответственно 2500 и 7000 микробов (по А.И. Шарифу).

Задание X.2. Количественный анализ микрофлоры воздуха.

Для ориентировочного и сравнительного определения загрязненности воздуха используется седиментационный метод, при котором учитывается общее количество микроорганизмов, осевших на агаровую пластинку чашки Петри за единицу времени. Более точные методы аспирационные при помощи аппарата Кротова.

В стерильные чашки Петри, соблюдая стерильность, разливают разогретый МПА.

Для заражения чашки Петри открывают в исследуемом помещении на 5–20 мин (время экспозиции). Крышку чашки Петри снимают, не переворачивая, ставят рядом. Затем чашки Петри закрывают.

Чашки Петри помешают на 2–3 суток в термостат. На следующем занятии подсчитывают число колоний. Пересчитывают число колоний на 1 дм^2 .

Колонии микроорганизмов, выделенные на чашках Петри, могут использоваться для работы по идентификации видов.

Результаты отражаются в таблице:

Исследуемое помещение	Время экспозиции, мин	Число колоний на поверхности чашки Петри

Домашнее задание

Изучите вопрос «Микрофлора воздуха». Запишите в тетрадь показатели санитарного состояния воздуха помещений (микробное число, число санитарно-показательных бактерий); способы передачи воздушной инфекции и меры защиты.

Задание X.3.

Задание: в тетрадь записать характеристики основных групп почвенной микрофлоры, зарисовать схему структуры микробоценоза почвы. Определить общее количество бактерий в анализируемой почве.

Выделение и количественный учет микроорганизмов почвы на твердых питательных средах

Общее количество микроорганизмов в почве свидетельствует об интенсивности биохимических процессов, протекающих в почве и определяющих накопление элементов корневого питания растений. Количество микроорганизмов в почве определяют методом посева почвенной суспензии на питательные среды либо прямым микроскопическим счетом клеток на препаратах.

Метод посева почвенной суспензии на твердые питательные среды (МПА, КАА, среду Эшби, среду Чапека) позволяет учесть общее количество микроорганизмов и получить на пластинке с агаром изолированные колонии для выделения микроорганизмов в чистую культуру.

Микроорганизмы, выделенные в чистую культуру, в дальнейшем могут быть всесторонне изучены и идентифицированы. В этом прежде всего заключается ценность этого метода.

Соблюдая стерильность, на часовом стекле отвешивают 10 г почвы и переносят ее в стерильную ступку. Навеску почвы в ступке увлажняют до пастообразного состояния, добавляя 2–3 мл воды из первой колбы, содержащей 90 мл стерильной воды и растирают 5 мин пальцем в резиновой перчатке. После растирания почву из ступки переносят с помощью воды во вторую сухую колбу, получают первое разведение –1:10, 1:100, 1:1000.

Стерильной пипеткой наносят каплю почвенной суспензии из соответствующего разведения. Засеянные чашки Петри переворачивают средой вверх и помещают в термостат при температуре 28–30° С. Через 3–5 суток подсчитывают колонии бактерий.

Контрольные вопросы

1. Микроорганизмы атмосферы: их состав и значение.
2. Санитарное состояние воздуха помещений; показатели санитарного состояния.

3. Группы природных вод по характеру микрофлоры.
4. Роль бактерий в водоемах.
5. Водоочистка, охрана вод от загрязнения.
6. Санитарные характеристики питьевой воды.
7. Микрофлора почвы, структура микробоценоза, группы почвенной микрофлоры.

Самостоятельная работа

Изучите и запишите в тетрадь:

- 1) группы природных вод по происхождению и характеру микрофлоры и по сапробности;
- 2) укажите основные показатели санитарного состояния (коли-титр и коли-индекс);
- 3) выделите роли микроорганизмов в водоемах;
- 4) проведите анализ питьевой воды и делайте выводы.

ЛИТЕРАТУРА

- Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 139–149.
- Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1987. – Гл. IX. – С. 158–171.
- Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М., 1987. – С. 64–75; 145–161.
- Аникеев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – С. 54–80.

ТЕМА XI. Метаболизм прокариот

Цели и задачи темы:

1. Изучить основные особенности энергетического и конструктивного метаболизма прокариотических микроорганизмов.
2. Рассмотреть основные типы брожения, выяснить особенности путей превращения глюкозы.
3. Изучить характерные черты различных групп микроорганизмов, осуществляющих разные типы брожения.
4. Научиться выделять и микроскопировать бактерии молочнокислого брожения, уксуснокислых и маслянокислых бактерий в продуктах питания и других субстратах.

Оборудование: Наборы для микробиологических исследований (см. ранее), кефир, капустный и огуречный рассол, культура прокисшего пива, культура «крапивные снопики» и картофельной палочки, видеоустановка.

Задание XI.1. Микроскопирование молочнокислых бактерий молочных продуктов и продуктов квашения (силосования). Запишите способы выделения и приготовления препаратов молочнокислых бактерий, их основные виды и характеристики. Рассмотрите препараты. Зарисуйте препараты.

Методика микроскопирования молочнокислых бактерий.

Готовят препарат из прокисшего молока. Петлю вводят в сгусток, и повернув вокруг оси, извлекают, прикасаясь ею и к пленке. Сгусток размазывают на предметном стекле очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром (1:1), несколько раз нанося фиксирующую смесь на мазок, не сливая ее.

Фиксированный препарат окрашивают метиленовой синькой 2–3 мин, промывают водой, высушивают, и рассматривают с иммерсией. Обнаружить: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* и молочную плесень – *Geotrichum candidum*.

Характеристика таксономических групп гомоферментативных молочнокислых бактерий (Г-, не образуют спор, неподвижны).

Род и подрод бактерий, виды	Морфология и особенности деления	Молярное содержание ГЦ в ДНК	Конфигурация молочной кислоты
<i>Streptococcus</i>	Сферические, овальные; делятся в одной плоскости, образуют пары или цепочки.	33–34	D
p. <i>Pediococcus</i> p. <i>Cerevisiae</i>	Кокки; делятся в двух плоскостях, образуются тетрады клеток.	32–34	DL
p. <i>Lactobacillus</i>	Палочки; делятся в одной плоскости, образуют пары или цепочки клеток	32–46	L

L. plantarum – осуществляют гетероферментативное молочнокислое брожение.

65–90% сахаров превращают в молочную кислоту, продуцируют DL-формы молочной кислоты.

- слабо развиты биосинтетические возможности;
- ауксотрофы;
- примитивность конструктивного метаболизма;
- находятся на начальном этапе эволюции;
- распространены: там, где могут обеспечить себя питательными веществами: на поверхности органических остатков, на слизистых оболочках пищеварительного тракта. Микроорганизмы важнейших молочно-

кислых продуктов:

- простокваша – *Streptococcus lactis*;
- в (Болгарии) – *Lactobacillus bulgaricus*;
- ацидофилин содержит *Lactobacillus acidophilus*;
- кефир – бактерии + дрожжи (*Geotrichum candidum*);
- суммарная реакция гомоферментативного молочнокислого брожения: глюкоза + Фн + 2 АДФ – образуют 2 мол. кислоты + 2АТФ + 2Н₂О.

Задание XI.2. Выделение и микроскопирование уксуснокислых бактерий (род *Acetobacter*) из пленки, образовавшейся на пиве. Записать последовательность операций, характеристику уксуснокислого брожения. Окрашивать фуксином. Записать характеристику и зарисовать вид микроорганизмов рода *Ацетобактер*.

Выделение уксуснокислых бактерий.

В конические колбы (на 100–150 мл) наливают слоем 0,5–1,0 см пиво, колбы закрывают ватными пробками и ставят в термостат при – 3СРС на 5–6 суток.

Приготовить мазок из пленки, образовавшейся на поверхности. Окраска фуксином. Фиксация над пламенем спиртовки.

Задание XI.3. Микроскопирование маслянокислых бактерий.

Из пробирки с культурой картофельной палочки пипеткой из среднего слоя жидкости берут пробу, наносят на предметное стекло. Добавляют каплю р-ра Люголя и рассматривают под иммерсией. Обнаруживают. Сине-фиолетовое окрашивание клеток обусловлено гранулезой. Записать и изучить характеристику рода *Клостридий*.

Задание XI.4. Микроскопирование возбудителей брожения пектиновых веществ.

Извлекают снопик из пробирки, берут из середины его несколько соломинок и выжимают из них немного жидкости на предметное стекло, добавляют каплю р-ра Люголя, микроскопируют под иммерсией.

Найдите крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования (барабанная палочка), и прерывистым расположением гранулезы (*Clostridium pectinovorum*).

Более мелкие сигарообразные палочки (*Clostridium felsineum*) со спорой на конце, гранулеза заполняет всю вегетативную клетку.

Информационный материал

1. Характеристика гетероферментативных молочнокислых бактерий. В основе гетероферментативного молочнокислого брожения лежит пентозофосфатный путь сбраживания гексоз или пентоз с образованием молочной кислоты, уксусной кислоты, этилового спирта, глицерина, углекислого газа. Суммарная реакция ПФП:

Глюкоза → молочная кислота + уксусная кислота + этиловый спирт + глицерин + углекислый газ. Образуются одна или две молекулы АТФ.

Облигатные гетероферментативные молочнокислые бактерии принадлежат родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*.

Они не имеют ферментов-альдозазы и триозофосфатизомеразы, поэтому не могут вести брожение по ГЛП.

Морфологически, культурально и физиологически близки к гомоферментативным. Способны расти при t° от 7–10 до 40–42°C, оптимум – 30°C, выдерживают закисление.

Род *Bifidobacterium* – представители нормальной микрофлоры кишечника человека и животных; многие из них обладают антибиотическими способностями.

2. Характеристики рода клостридий

Род *Clostridium* – бактерии этого рода осуществляют классическое маслянокислое брожение, а также ацетоно-бутиловое брожение.

Для рода клостридий характерно выделение нескольких физиологических групп, в зависимости от вида сбраживаемого субстрата.

Сахаролитические клостридии – используют вещества углеводной природы, спирты, органические кислоты, и протеолитические – белки, пептиды, аминокислоты, пуринолитические осуществляют сбраживание пуринов и пиримидинов.

Клостридии – облигатные анаэробы, молодые вегетативные клетки имеют форму палочек, подвижны (перитрихи), грамположительны. По мере старения накапливают гранулезу и теряют подвижность, переходят к спорообразованию, становясь веретенообразными (клостридиальный тип).

Самостоятельная работа

К каким группам принадлежат бактерии пропионовокислого брожения?

Что такое карбонатное, сульфатное, нитратное дыхание? Какие бактерии способны к такому типу дыхания?

Какие микроорганизмы осуществляют спиртовое брожение? Можно ли повлиять на выход продуктов этого брожения? В чем суть «эффекта Пастера»?

Напишите примерное строение ЦПЭ у разных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 109–128.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1967. – Гл. VII. Метаболизм прокариот». – С. 104–129.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М., 1978. – С. 207–253.
4. Шлегель Г. Общая микробиология. – М. 1972. – Гл. VII. – С. 202–278.
5. Аникеев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М., 1983. – С. 96–103.

ТЕМА XII. Коллоквиум. Прокариоты и окружающая среда

Цели занятия:

1. Уяснить основные способности прокарриот к расселению в окружающей среде, влияние внешних факторов на микроорганизмы.
2. Изучить типы взаимодействия микроорганизмов.
3. Уяснить взаимоотношения с макроорганизмами, выяснить роль микроорганизмов для человека и его здоровья.
4. Изучить основные методы профилактики и направления терапии инфекционных болезней.

Вопросы коллоквиума

1. Влияние физических и химических факторов среды на бактерии (влияние влажности, лучистой энергии, УЗК, реакции среды, O₂).
 2. Вещества-антисептики, действие бактериостатическое и бактерицидное. Дезинфекция.
 3. Взаимоотношения микроорганизмов: ассоциативные (метабиоз, симбиоз, комменсализм, сателлизм), конкурентные (антагонизм, антибиоз, паразитизм).
 4. Антибиотики: механизм действия и характер действия антибиотиков. Антибиотикорезистентность. Промышленное получение антибиотиков.
 5. Микрофлора ризосферы растений. Микрофлора ризопланы растений. Интенсивность процессов трансформации веществ в разные периоды жизни растений.
 6. Эпифитная микрофлора растений.
 7. Фитопатогенная микрофлора растений.
 8. Нормальная микрофлора человека и животных (облигатная и факультативная).
 8. Дисбактериоз: причины и характер процесса.
 9. Патогенные микроорганизмы. Инфекция. Вирулентность (DL). Токсины, инвазия, агрессины. Сепсис.
 10. Иммуитет: типы иммуитета.
 11. Фагоцитоз, стадии фагоцитоза.
 12. Антитела, их реакция с антигеном.
 13. Вакцины и вакцинация.
- Перечень возбудителей заболеваний у человека, животных и растений.

Самостоятельная работа

Возбудители заболеваний у человека и животных:

1. *Corynebacterium diphtheriae* – дифтерия.
2. *Mycobacterium tuberculosis* – туберкулез человека.
3. *Mycobacterium leprae* – проказа.

4. *Mycobacterium bovis* – туберкулез крупного рогатого скота.
5. *Treponema pallidum* – сифилис.
6. *Clostridium tetani* – столбняк.
7. *Clostridium botulinum* – ботулизм.
8. *Clostridium perfringens* – газовая гангрена.
9. *Clostridium histolyticum* – газовая гангрена.
10. *Clostridium septicum* – газовая гангрена.
11. *Clostridium novyi* – газовая гангрена.
12. *Salmonella typhi* – брюшной тиф.
13. *Shigella dysenteriae* – бактериальная дизентерия.
14. *Bordetella pertussis* – коклюш.
15. *Neisseria gonorrhoeae* – гонорея.
16. *Neisseria meningitidis* – менингит.
17. *Vibrio cholerae* – холера.
18. *Rickettsia prowazekii* – эпидемический сыпной тиф.
19. *Rickettsia typhi* – эпидемический или крысиный сыпной тиф.
20. *Streptococcus pneumoniae* – бактериальная пневмония.
21. *Streptococcus pyogenes* – рожа, ангина, скарлатина, абсцессы при раневых инфекциях.
22. *Bacillus anthracis* – сибирская язва крупного рогатого скота, которая передается людям.
23. *Bacillus thuringiensis* – паралитическое заболевание гусениц, чешуекрылых насекомых.
24. *Borrelia recurrentis* – эпидемический возвратный тиф или возвратная лихорадка.
25. *Leptospira canicola* – инфекционная желтуха.
26. *Pseudomonas aeruginosa* – гнойные инфекции, отиты наружного уха, эндокардиты, энтериты, пневмонии, инфекции мочевыводящих путей, артриты, остеомиелиты.
27. *Pseudomonas mallei* – сап лошадей.
28. *Klebsiella pneumoniae* – пневмонии, бактериемия, инфекции мочевыводящих путей, диареи у новорожденных.
29. *Yersinia pestis* – бубонная или легочная чума.
30. *Dermatophilus congolensis* – дерматоз у овец и лошадей.
31. *Staphylococcus aureus* – фурункулез, эндокардиты, пневмонии, артриты, остеомиелиты, пищевые токсикоинфекции.
32. *Chlamydia trachomatis* – урогенитальный хламидоз, венерическая лимфогранулема.
33. *Legionella pneumophila* – легионеллез («болезнь легионеров» или тяжелая пневмония).
34. *Mycoplasma pneumoniae* – пневмония.

Возбудители бактериозов у растений:

1. *Streptomyces scabies* – парша картофельная.
2. *Erwinia carotovora* – «мягкие» или «мокрые» гнили.
3. *Erwinia amylovora* – бактериальный ожог плодовых.
4. *Erwinia stewartii* – увядание кукурузы.
5. *Xanthomonas campestris* – черная гниль крестоцветных.
6. *Agrobacterium tumefaciens* – корончатый гал.
7. *Pseudomonas syringae* – некрозы плодовых.
8. *Pseudomonas solanacearum* – кольцевая гниль картофеля.
9. *Clavibacter sepedonicum* – кольцевая гниль картофеля.
10. *Clavibacter michiganense* – бактериальный рак томатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 126–139.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., – С. 71–103.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – 3-е изд. – М., 1992. – С. 124–135, 258–318, 78–85.
4. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М., 1989. – С. 347–430.
5. Шлегель Г. Общая микробиология. – М., 1987. – С. 366–402, 501–518.
6. Микробиология: методические рекомендации. – Мн., 2002. – 97 с.

ТЕМА XIII. Коллоквиум. Метаболизм прокариот

Цели занятий:

1. Изучить основные особенности процессов катаболизма и анаболизма прокариот.
2. Уяснить роль ферментов в метаболизме прокариот.
3. Изучить характеристики процессов брожения, суть процессов и основные механизмы различных типов брожения.
4. Выяснить характеристики важнейших групп микроорганизмов, осуществляющих брожение.
5. Уяснить роль аэробного окисления субстратов и его эволюционное значение, рассмотреть роль и место анаэробного окисления в процессах метаболизма.
6. Рассмотреть особенности анаболизма прокариот.

Вопросы коллоквиума

1. Ферменты прокариотной клетки. Регуляция активности ферментов, регуляция синтеза ферментов.
2. Клеточный метаболизм. Катаболизм прокариот. Цепь переноса электронов.

3. Типы жизни, основанные на субстратном фосфорилировании: гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение.
4. Процессы брожения. Пути превращения глюкозы в пировиноградную кислоты в клетке бактерий: схема Энтнера-Дудорова; пентозофосфатный путь.
5. Спиртовое брожение. Химизм и промышленное использование: виноделие, пивоварение, хлебопечение, производство спирта.
6. Маслянокислое брожение. Ацетоно-бутиловое брожение. Характеристика маслянокислых бактерий.
7. Пропионовокислое брожение.
8. Аэробное окисление органического и неорганического субстрата. Цикл Кребса.
9. Анаэробное окисление. Денитрификация и сульфатредуцирующие бактерии. Значение различных способов получения энергии в эволюции прокариот.
10. Анаболизм прокариот. Биосинтез углеводов, аминокислот, нуклеотидов, липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 126–139.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1967. – С. 104–29.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – 3-е изд. – М., 1992. – С. 203–320, 85–107, 111–123.
4. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М., 1989. – С. 202–299.
5. Шлегель Г. Общая микробиология. – М., 1987. – С. 213–302, 325–328.

ТЕМА XIV. Коллоквиум. Участие микроорганизмов в процессе трансформации основных биогенных элементов

Цели занятия:

1. Выяснить роль микроорганизмов в процессах трансформации основных биогенных элементов (углевода, азота, фосфора, серы, железа и др.).
2. Изучить основные этапы и процессы трансформации элементов.

Вопросы коллоквиума:

1. Роль микроорганизмов в круговороте веществ.
2. Процессы трансформации углеродсодержащих веществ; разложение целлюлозы, гемицеллюлозы, разложение лигнина, пектина, углеводов.
3. Процессы трансформации азотсодержащих веществ: аммонификация, нитрификация, денитрификация, биологическая фиксация молеку-

лярного азота.

4. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы.
5. Симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы.
6. Заражение растений клубеньковыми микроорганизмами.
7. Химизм процесса биологической фиксации азота.
8. Бактериальное удобрение.
9. Процессы трансформации органических и неорганических соединений фосфора.
10. Процессы трансформации органических, неорганических соединений серы (иммобилизация, сульфификация, десульфификация).
11. Процессы трансформации соединений Fe, Mn, др. Me.

ЛИТЕРАТУРА

1. Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 126–139.
2. Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1967. – С. 130–158.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – 3-е изд. – М., 1992. – С. 349–396.
4. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М., 1989. – С. 348–360, 395–401, 403–429, 510–516.

ТЕМА XV. Коллоквиум. Основы вирусологии

Цель занятия:

1. Изучить особенности биологии неклеточных форм жизни: вирионов и прионов.
2. Рассмотреть структурную организацию вирионов, цикл репродукции вирусов, особенности культивирования, лечения и профилактики вирусных и прионовых инфекций.

Вопросы коллоквиума

1. Специфичность вирусов. Происхождение вирусов. Принципиальное отличие вирусов.
2. Строение вирионов. Строение капсида.
3. Суперкапсид: строение и его формирование.
4. НК-ты вирусов: РНК-вирусы, ДНК-вирусы. Ковирусы и моновирусы.
5. Цикл репродукции вирусов.
6. Типы отношения вирусов с клеткой хозяина: продуктивная инфекция, abortивная инфекция, вирогения.
7. Синтез компонентов вируса: основные этапы процесса.

8. Культивирование вирусов: основные методы.
9. Вирусный канцерогенез.
10. Вирусные инфекции человека.
11. Профилактика и лечение вирусных инфекций.
12. ВИЧ-инфекция, другие опасные вирусные инфекции современности.
13. Новые инфекционные агенты-прионы.

ЛИТЕРАТУРА

- Царенко Т.М. Микробиология с основами вирусологии. – Витебск, 2004. – С. 126–139.
- Лукомская К.А. Микробиология с основами вирусологии. – М., 1967. – Гл. 9. – С. 172–189.
- Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М., 1989. – С. 9–13.
- Щлегель Г. Общая микробиология. – М., 1987. – С. 117–136.
- Ronald M. Atlas WCB., 1993, Principles of Microbiologie, 1994. – P. 290–382.

Дополнительная литература по курсу

1. Сассон Альберт. Биотехнология: свершения и надежды. – М., 1987.
2. Реннеберг Р., Реннеберг И. От пекарни до биофабрики. – М., 1991.
3. Елинов Н.П. Химическая микробиология. – М., 1989.
4. Ronald M. Atlas WCB., 1993. Principles of Microbiologie. 1994.
5. Zansing M. Prescott ets. Microbiology, WCB. 1993.
6. Голубев Д., Солоухин В. Размышления и споры о вирусах. – М., 1969.
7. Лурия С., Дарнелл Дж. и др. Общая вирусология. – М., 1981.
8. Нейман Б.Я. Индустрия микробов. Наука и прогресс. – М., 1963.
9. Общая и частная вирусология. – М., Медицина, 1962. – Т. 1–2.
10. Полупанов В.С. Внеклеточные белки микроорганизмов. – Мн., 1966.
11. Стейнер, Эдельберг Э. Ингрэм Дж. Мир микробов. – М., 1979. – Т. 1–3.
12. Тимаков В.Д., Левашов В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. – М., 1983.
13. Яковенко К.Н., Троицкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. – Мн., 1985.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ЗАЧЕТА ПО МИКРОБИОЛОГИИ С ОСНОВАМИ ВИРУСОЛОГИИ

1. Предмет микробиологии, специфика методов исследования микроорганизмов.
2. Специфические черты прокариотных организмов.
3. Сравнительная характеристика структурной организации прокариот.
4. Роль микроорганизмов в природе и народном хозяйстве.
5. Биотехнология и ее основные направления.
6. Открытие микромира. Морфологический период микробиологии.
7. Физиологический период микробиологии, вклад ученых.
8. Почвенная микробиология и главные направления раздела.
9. Открытие вирусов.
10. Биохимические направления в микробиологии.
11. Микробиология XX столетия: вклад микробиологии в развитие микробиологических наук.
12. Особенности структурной организации прокариотной клетки.
13. Форма и размеры прокариот.
14. Структуры прокариотной клетки.
15. Клеточная стенка: в-ва, функции, окраска «по Граму».
16. Строение клеточных стенок грациликутных бактерий.
17. Строение клеточной стенки фирмакутных бактерий.
18. Особенности клеточных стенок микобактерий, археобактерий.
19. Образование протопластов, сферопластов, L-форм.
20. Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
21. Мезосомы, типы, функции.
22. Жидкостно-мозаичная модель мембраны.
23. Транспортные и другие функции ЦПМ.
24. Органоиды прокариотной клетки.
25. Запасные вещества прокариот.
26. Нуклеоид, плазмиды, эписомы.
27. Механизмы репликации бактериальной хромосомы.
28. Капсула, химизм, структура, функции.
29. Жгутики: строение, расположение, движение.
30. Типы движения у бактерий.
31. Фимбрии (пили): строение, типы, функции.
32. Эндоспоры, их биологический смысл, строение, типы, формирование, прорастание.
33. Принципы классификации прокариот по определителю Берги (1997).
34. Международная классификация прокариот.
35. Рост и размножение бактерий.
36. Рост бактериальной популяции в статической культуре. Фазы роста.
37. Непрерывные и синхронные культуры.

38. Генетика прокариот. Рекомбинация у прокариот. Перспективы генной инженерии.
39. Группы микроорганизмов по отношению к факторам окружающей среды (свет, температура, кислород, влажность).
40. Антисептики.
41. Взаимоотношения микроорганизмов: метабиоз, симбиоз, комменсализм, сателизм.
42. Антагонизм, паразитизм; антибиотики. Антибиотикорезистентность.
43. Микрофлора растений: ризосфера, ризоплана, динамика микрофлоры.
44. Нормальная микрофлора человека и животных.
45. Патогенные микроорганизмы, вирулентность, инфекции.
46. Иммуитет, профилактика и терапия инфекционных заболеваний.
47. Пищевые потребности прокариот, прототрофы, ауксотрофы, факторы роста.
48. Типы питания прокариот.
49. Бактериальный фотосинтез, его принципиальное отличие от фотосинтеза растений, ФЛАТ.
50. ХЛАТ. ХОГТ. ФОАТ.
51. Ферменты прокариот: строение, типы.
52. Метаболизм прокариот: катаболизм, анаболизм, синтез углеводов, аминокислот, липидов.
53. Цепь переноса электронов (ЦПЭ).
54. Брожение: суть, типы брожения. Черты примитивности брожения. Использование.
55. Пути превращения глюкозы в ПВК.
56. Цикл Кребса, его значение в метаболизме прокариот.
57. Неполное аэробное окисление орг. в-в. Уксуснокислые бактерии.
58. Молочнокислородное брожение и микроорганизмы брожения (хар-ка).
59. Аэробное окисление неорг. в-в.
60. Анаэробное окисление: нитратное и сульфатное дыхание, значение в природе и практике с/х.
61. Процессы трансформации С-содержащих веществ: целлюлозы, пектина и др.
62. Трансформация N-содержащих веществ.
63. Аммонификация.
64. Нитрификация.
65. Денитрификация.
66. Азотфиксация (бактерии – азотфиксаторы). Химизм азотфиксации. Значение процесса.
67. Трансформация соединений S.
68. Трансформация Mn и др.
69. Трансформация Fe-соединений.
70. Трансформация соединений P.
71. Микрофлора воздуха, санитарное состояние воздуха помещений.

72. Микрофлора воды. Санитарные показатели питьевой воды.
73. Роль микроорганизмов в водоемах, система очистки воды.
74. Микрофлора почвы. Структура микролокуса и микробиоценоза почвы.
75. Группы почв микроорганизмов, влияние агротехнических приемов на микрофлору почвы.
76. Вирус, вирион, специфичность организации и происхождение.
77. Структуры вирионов.
78. Цикл репродукции вирионов.
79. Культивирование вирусов.
80. Вирусные инфекции. СПИД. Лечение и профилактика вирусных инфекций.
81. Вирусный канцерогенез. Канцерогенное действие алкоголя и никотина, др. продуктов табака.
82. Прионы – новые инфекционные агенты. Прузинер, 1997 г. (Нобел. премия). Болезни прионовые.
83. Типы питательных сред.
84. Методы стерилизации.
85. Иммерсия. Правила работы с иммерсионной системой.
86. Методика приготовления фиксированных препаратов (и препаратов-отпечатков).
87. Методика приготовления прижизненных препаратов.
88. Методика выявления капсул.
89. Окраска спор бактерий.
90. Окраска клеток по Граму.
91. Методика количественного анализа микрофлоры воды, воздуха.
92. Окраска и выявление запасных в-в бактерий.
93. Типы микроскопии.
94. Предполагаемый ход эволюции.
95. Археобактерии.
96. Вакцины. Сыворотки. Иммуномодуляторы, иммуностимуляторы.
97. Достижение микробиологии.
98. Вклад отечественных ученых в развитие микробиологии (по материалам учебника и дополнительной литературы).
99. Роль микроорганизмов в решении глобальных проблем человечества.
100. Субстратное фосфорилирование и окислительное фосфорилирование, эффективность этих процессов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПИСЬМЕННОГО КОНТРОЛЯ (приводится примерный перечень)

1. Укажите основные свойства бактериоцинов:
 1. Представлены белками или белками в комплексе с липополисахаридами.
 2. Представлены углеводами.
 3. Синтез зарепрессирован.
 4. Действует на близкородственные бактерии.
 5. Взаимодействуют через неспецифическое связывание.
 6. Взаимодействуют через специализированные рецепторы.

А. 2, 3, 4, 5 В. 1, 3, 4, 6
Б. 1, 3, 4, 5 Г. 2, 3, 4, 5
2. Укажите основные свойства крупных плазмид:
 1. Отвечают за фенотипические признаки бактерий.
 2. Способны к автономной репликации.
 3. Характерен ослабленный контроль репликации.
 4. Совместимы друг с другом в клетках бактерий разных видов.
 5. Стабильно наследуются в бактериях различных видов.

А. 1, 2 Г. 3, 4
Б. 2, 4 Д. 4, 5
В. 1, 3 Е. 1, 4
3. Укажите основные биологические особенности бактерий рода *Pseudomonas*:
 1. Грамотрицательная палочка.
 2. Осуществляют катаболизм гексоз путем Энтнера-Дудорова.
 3. Осуществляют катаболизм гексоз пентозофосфатным путем.
 4. Метаболизм бродильный.
 5. Имеют полярное расположение жгутиков.

А. 1, 2, 5 Г. 2, 4, 5
Б. 1, 3, 5 Д. 1, 4, 5
В. 3, 4, 5
4. Какие из перечисленных бактерий относятся к архебактериям?
 1. *Clostridium tetani*.
 2. *Erwinia carotovora*.
 3. *Thermoplasma acidophilum*.
 4. *Halobacterium salinarium*.
 5. *Methanothermus fervidus*.
 6. *Thiobacillus ferrooxidans*.

- | | |
|------------|------------|
| А. 4, 5, 6 | Г. 3, 4, 6 |
| Б. 3, 4, 5 | Д. 2, 3, 4 |
| В. 1, 2, 5 | |

5. Укажите характерные особенности представителей семейства Enterobacteriaceae:

1. Кислотоустойчивые.
2. Хемолитоавтотрофы.
3. Хемоорганогетеротрофы.
4. Факультативные анаэробы.
5. Продуцируют масляную кислоту.
6. Не образуют эндоспор.
7. Грамотрицательные.

- | | |
|---------------|---------------|
| А. 1, 3, 4, 7 | Г. 1, 4, 5, 7 |
| Б. 3, 4, 6, 7 | Д. 1, 2, 4, 7 |
| В. 2, 4, 5, 7 | |

6. Фермент нитрогеназа катализирует реакции:

- А. Превращения нитритов в нитраты.
- Б. Синтеза глутамина из глутаминовой кислоты.
- В. Активирование молекулярного азота и восстановителя при биологической фиксации молекулярного азота.
- Г. Окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты.

7. Укажите свойства пурпурных бактерий:

1. В клетках содержат бактериохлорофилл «а» или бактериохлорофилл «в».
2. В клетках содержат хлорофилл «а».
3. Фотосинтетические пигменты локализованы в хлоросомах.
4. Все элементы фотосинтетического аппарата локализованы в цитоплазматической мембране и ее производных.
5. В процессе фотосинтеза осуществляется циклический и нециклический транспорт электронов.
6. В процессе фотосинтеза осуществляется циклический и обратный транспорт электронов.

- | | |
|------------|------------|
| А. 2, 4, 6 | Г. 2, 3, 5 |
| Б. 1, 3, 5 | Д. 2, 4, 5 |
| В. 1, 4, 6 | |

8. Возбудителями сифилиса являются бактерии:

- А. *Spirochaeta aurantia*.
- Б. *Bacillus anthracis*.
- В. *Treponema pallidum*.

Г. *Clavibacter michiganense*.

Д. *Corynebacterium bovis*.

Е. *Rickettsia prowazekii*.

9. Брожение смешенного типа у бактерий приводит к образованию всех ниже перечисленных продуктов, кроме:

А. Ацетата.

Г. Лактата.

Б. Формиата.

Д. Этанол.

В. Бутирата.

10. Какая аминокислота должна присутствовать в среде для определения способности бактерий к образованию индола?

А. Метионин.

Г. Фенилаланин.

Б. Лизин.

Д. Гистидин.

В. Триптофан.

11. Какие из перечисленных микроорганизмов входят в состав нормальной микрофлоры человека?

1. *Streptococcus faecalis*.

2. *Staphylococcus aureus*.

3. *Bifidobacterium bifidum*.

4. *Bordetella pertussis*.

5. *Candida albicans*.

А. 1, 3

Г. 1, 3, 5

Б. 1, 2, 5

Д. 3, 4

В. 1, 2, 3

12. Для каких бактерий характерен пентозофосфатный путь окисления гексоз?

А. Гетероферментативных молочнокислых бактерий.

Б. Маслянокислых бактерий.

В. Пропионовокислых бактерий.

Г. Гомоферментативных молочнокислых бактерий.

13. Аэробные бактерии содержат переносчики электронов или атомов водорода:

1. Менахиноны.

2. Меркаптоэтанолсульфаты.

3. Редуктазы.

4. **FeS**-белки.

5. Сукцинатдегидрогеназы.

А. 1, 3, 4

Г. 2, 4

Б. 4, 5

Д. 2, 4, 5

В. 1, 4, 5

14. *Hfr*-доноры бактерий образуются:
- А. При эксцизии конъюгативных плазмид из хромосомы.
 - Б. В результате гомологичной рекомбинации между *IS*-элементами конъюгативной плазмиды и хромосомы.
 - В. При интеграции в хромосому нетрансмиссивных плазмид.
 - Г. В результате негомологичной рекомбинации при эксцизии плазмид из хромосомы.

15. Сексдукция – это:

- А. Половой процесс у бактерий.
- Б. Передача конъюгативных плазмид в реципиентные клетки.
- В. Передача хромосомных генов в составе F-плазмиды.
- Г. Излечение бактериальных клеток от плазмид.

16. Лизогенные бактерии – это:

- А. Бактерии, в хромосому которых интегрирован половой фактор.
- Б. Бактерии, в которых осуществляется литический цикл.
- В. Бактерии, в хромосому которых интегрирована ДНК-фага.
- Г. Бактерии, для которых не характерна фаговая конверсия.

17. Факторами вирулентности фитопатогенных бактерий является:

- 1. Полигалактуроназы.
- 2. Гемицеллюлазы.
- 3. Метилазы.
- 4. Полисахариды слизистых веществ.
- 5. Гетероауксины.
- 6. Пирокатехины.

А. 2, 3, 5, 6

Г. 2, 3, 4, 5

Б. 3, 4, 5, 6

Д. 1, 2, 4, 5

В. 1, 2, 5, 6

18. Какие из перечисленных бактерий относятся к эпифитной микрофлоре растений?

- 1. *Bacillus cereus*.
- 2. *Erwinia herbicola*.
- 3. *Clostridium botulinum*.
- 4. *Leuconostoc mesenteroides*.
- 5. *Streptococcus plantarum*.
- 6. *Lactobacillus brevis*.

А. 4, 5, 6

Г. 2, 4, 5, 6

Б. 1, 2, 4, 5

Д. 2, 3, 4, 5

В. 2, 5, 6

19. Азотистая кислота индуцирует возникновение мутаций за счет того, что:

- А. Внедряется между соседними основными в цепи ДНК.
- Б. Алкилирует гуанин в репликативной вилке.
- В. Замещает аминогруппу гидроксильной группой в молекуле аденина.
- Г. Вызывает образование димеров тимина.

20. Сколько в среднем молекул АТФ образуется при сбраживании одной молекулы глюкозы маслянокислыми бактериями?

- А. 4
- Б. 2
- В. 3, 3
- Г. 3
- Д. 2, 5

21. Сколько молекул АТФ образуется при окислении одной молекулы ФАДН₂ в дыхательной цепи дрожжей?

- А. 3
- Б. 1
- В. 2
- Г. Нет верного ответа

22. Предшественниками для синтеза пиримидиновых нуклеотидов являются:

- 1. Глутамин.
- 2. 5-фосфорибозил.
- 3. Карбамоилфосфат.
- 4. Эритрозо-4-фосфат.
- 5. Аспартат.

23. Стеклопосуду можно простерилизовать следующими способами:

- 1. Текучим паром.
- 2. Насыщенным паром под давлением.
- 3. Сухим горячим воздухом.
- 4. Тиндализацией.

- А. 2, 4
- Б. 1, 4
- В. 1, 3
- Г. 2, 3

24. Какие из перечисленных типов мутантов можно выделить методами прямого отбора?

- 1. Ауксотрофные.
- 2. Устойчивые к антибиотикам.
- 3. Способные утилизировать нетрадиционные источники углерода или азота.
- 4. С измененной способностью к сбраживанию углеводов.
- 5. Температурочувствительные.

А. 1, 5
Б. 2, 5
В. 3, 4

Г. 2, 3
Д. 1, 4

25. Синхронные бактериальные культуры – это:

- А. Культуры, имеющие постоянный химический состав.
- Б. Культуры, в которых клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла и делятся одновременно.
- В. Культуры, в которых удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции.
- Г. Культуры, в которых постоянное количество клеток.

26. Оператор. Какие из приведенных утверждений об этой генетической единице верны?

- 1. Оператор – место связывания репрессора.
- 2. Оператор – место связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы.
- 3. В генах оператора происходят мутации.
- 4. Оператор – строго определенная последовательность нуклеотидов.

А. 1, 4

В. 1, 3

Б. 2, 3

Г. 2, 4

27. Какие из перечисленных видов бактерий не являются гаплоидными?

- 1. *Rhodobacter sphaeroides*.
- 2. *Bacillus subtilis*.
- 3. *Agrobacterium tumefaciens*.
- 4. *Pseudomonas cepacia*.
- 5. *Pseudomonas aeruginosa*.
- 6. *Escherichia coli*.

А. 1, 3, 4

В. 3, 4, 6

Б. 1, 2, 3

Г. 2, 3, 5

28. Антибиотик стрептомицин подавляет синтез белка, потому что:

- А. Действует на 50S-субъединицы рибосом.
- Б. Нарушает функционирование 30S-субъединиц рибосом.
- В. Нарушает функционирование фактора элонгации.
- Г. Нарушает функционирование растворимых факторов, принимающих участие в биосинтезе белка.

29. В основе круговорота основных биогенных элементов в природе лежит:

- А. Антагонизм. Г. Метабиоз.
- Б. Синергизм. Д. Хищничество.
- В. Сателлитизм.

30. Аутоинфекция – это:

- А. Заболевание, вызванное условно-патогенными микроорганизмами.
- Б. Заболевание, вызванное микроорганизмами с ослабленной вирулентностью.
- В. Качественное и количественное нарушение микрофлоры в организме.

31. Какие генетические проблемы можно решить, используя в качестве объекта дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*?

- 1. Получить генные мутации.
- 2. Получить хромосомные мутации.
- 3. Построить генетическую карту.
- 4. Изучить мейоз.
- 5. Изучить митоз.
- 6. Получить внехромосомные мутации.
- 7. Использовать Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* для клонирования генов в данном объекте.
- 8. Осуществить трансформацию.
- 9. Изучить нуклеотидную последовательность ДНК:

- А. Только 1, 3, 9.
- Б. Все, кроме 7.
- В. Все, кроме 2, 4, 7, 8.
- Г. Все, кроме 3, 4, 5, 7.
- Д. Только 1, 2, 5, 6.
- Е. Ни одной.

32. Пользуясь информацией вопроса 31, определите, какие генетические проблемы можно решить, используя в качестве объекта прионы?

- А. Все, кроме 7.
- Б. Ни одной.
- В. Только 1 и 9.
- Г. Все, кроме 3, 4, 5, 7.
- Д. Только 4, 5, 6.

33. Пользуясь информацией вопроса 31, определите, какие генетические проблемы можно решить, используя в качестве объекта *Zea mays* (кукурузу)?

- А. Все.
- Б. Все, кроме 7.
- В. Все, кроме 6, 8, 9.
- Г. Только 1, 2, 3, 4, 5.
- Д. Все, кроме 9.

34. Пользуясь информацией вопроса 31, определите, какие генетические проблемы можно решить, используя в качестве объекта *Escherichia coli* (кишечную палочку)?

- А. Все.
- Б. Все, кроме 4.
- В. Только 1, 3, 5.
- Г. Только 1.
- Д. 1, 3, 6, 8, 9.

35. Какой геном у ВИЧ?

- А. Двухцепочечная ДНК кольцевая.
- Б. Двухцепочечная ДНК линейная.
- В. Две одноцепочечные молекулы РНК.
- Г. Одноцепочечная ДНК.
- Д. Две нити РНК фрагментированные.