

Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования «Витебский государственный  
университет имени П.М. Машерова»  
Кафедра зоологии и ботаники

**С.Э. Латышев, Е.А. Держинский**

# **МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Методические рекомендации*

*Витебск  
ВГУ имени П.М. Машерова  
2021*

УДК 579+573(075.8)  
ББК 28.4я73+28.087.1я73  
Л27

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 7 от 29.06.2021.

Авторы: старший преподаватель кафедры зоологии и ботаники ВГУ имени П.М. Машерова **С.Э. Латышев**; доцент кафедры зоологии и ботаники ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук **Е.А. Держинский**

Рецензент:  
декан факультета химико-биологических и географических наук  
ВГУ имени П.М. Машерова,  
кандидат биологических наук, доцент *Т.А. Толкачева*

**Латышев, С.Э.**  
**Л27** Микробиология с основами биотехнологии : методические рекомендации / С.Э. Латышев, Е.А. Держинский. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2021. – 54 с.

В издании перечислены общепринятые методики для изучения структурной организации клетки, физиолого-биохимических и экологических особенностей. Приведены термины и дано краткое описание различных клеточных структур, особенностей метаболизма и связанных с ними биотехнологических процессов, способов стерилизации, методов посева и культивирования микроорганизмов, определения чувствительности к антибиотикам и взаимодействия прокариот.

Предназначено для студентов, магистрантов, преподавателей биологических специальностей вуза.

УДК 579+573(075.8)  
ББК 28.4я73+28.087.1я73

© Латышев С.Э., Держинский Е.А., 2021  
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2021

# СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>                                                                                                                                                        | <b>4</b>  |
| <b>РАЗДЕЛ I. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ ..</b>                                                                                                              | <b>6</b>  |
| Лабораторная работа № 1. Устройство микробиологической лаборатории. Правила техники безопасности. Общие правила приготовления препаратов фиксированных микроорганизмов ..... | 6         |
| Лабораторная работа № 2. Простое окрашивание микроорганизмов .....                                                                                                           | 9         |
| Лабораторная работа № 3. Окрашка микроорганизмов по Граму .....                                                                                                              | 10        |
| Лабораторная работа № 4. Окрашка капсулы бактерий. Выявление цитоплазматических включений .....                                                                              | 11        |
| Лабораторная работа № 5. Окрашка эндоспор бактерий. Окрашка нуклеоида. Определение кислотоустойчивости бактерий .....                                                        | 13        |
| Лабораторная работа № 6. Приготовление прижизненных препаратов и определение подвижности микроорганизмов .....                                                               | 16        |
| <b>РАЗДЕЛ II. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ ...</b>                                                            | <b>18</b> |
| Культивирование и способы посева микроорганизмов .....                                                                                                                       | 18        |
| Классификация питательных сред .....                                                                                                                                         | 18        |
| Способы стерилизации .....                                                                                                                                                   | 19        |
| Типы культур микроорганизмов. Способы выделения чистой культуры .....                                                                                                        | 20        |
| Лабораторная работа № 7. Посев и пересев микроорганизмов .....                                                                                                               | 24        |
| Лабораторная работа № 8. Описание колоний микроорганизмов .....                                                                                                              | 25        |
| Лабораторная работа № 9. Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов .....                                                                                              | 27        |
| Лабораторная работа № 10. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам .....                                                                                         | 31        |
| Лабораторная работа № 11. Определение антибиотической активности микроорганизмов .....                                                                                       | 33        |
| Лабораторная работа № 12. Учет численности микроорганизмов .....                                                                                                             | 36        |
| <b>РАЗДЕЛ III. БИОТЕХНОЛОГИЯ .....</b>                                                                                                                                       | <b>41</b> |
| Лабораторная работа № 13. Изучение маслянокислого брожения .....                                                                                                             | 41        |
| Лабораторная работа № 14. Изучение молочнокислого брожения .....                                                                                                             | 43        |
| Лабораторная работа № 15. Изучение спиртового брожения .....                                                                                                                 | 48        |
| Лабораторная работа № 16. Изучение уксуснокислого брожения .....                                                                                                             | 49        |
| Лабораторная работа № 17. Микробиологические основы хлебопечения .....                                                                                                       | 50        |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>                                                                                                                                               | <b>52</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

Микробиология – наука, изучающая микроорганизмы, имеющие размеры не более 0,1 мм. В соответствии с современными представлениями, представители микроорганизмов входят в состав трех доменов: Археи, Бактерии, Эукариоты. К ним относятся простейшие, одноклеточные водоросли, микроскопические грибы, бактерии, вирусы.

Благодаря уникальному разнообразию особенностей строения и метаболических процессов микроорганизмы заселили все среды жизни на нашей планете. По разным оценкам, количество видов микроорганизмов, использующих организм человека в качестве среды обитания, составляет свыше 500 видов, а число микробных клеток превышает число человеческих. Эти микроорганизмы выполняют различные функции: участвуют в обмене веществ, синтезируют витамины, стимулируют иммунную систему. Следует отметить, что более 100 видов бактерий являются возбудителями инфекционных заболеваний человека.

Такие особенности микроорганизмов, как высокая биохимическая активность, наличие разнообразных ферментативных систем, широкий спектр условий существования и используемых питательных субстратов, используются человеком для получения биологической продукции. Это направление изучает наука биотехнология. На современном этапе развития человечества достижения биотехнологии используются для получения продуктов питания, лекарств (антибиотики и вакцины), биологически активных веществ, альтернативных источников энергии, очистке окружающей среды, утилизации отходов.

Объектами исследования являются клетки микроорганизмов, химические вещества, полученные при участии микроорганизмов, и пищевые продукты, для производства которых используются биотехнологические процессы.

Материалы издания представляют собой руководство для проведения лабораторных работ и содержат краткий теоретический материал по особенностям строения, экологии, культивирования, физиолого-биохимическим особенностям, и биотехнологическим процессам, протекающим при участии микроорганизмов. Описаны методы по проведению качественного и количественного исследования микроорганизмов, приготовлению и стерилизации питательных сред. Предложенные методики являются классическими, используются во многих лабораториях. При описании методов изучения микроорганизмов были учтены требования инструкции по охране труда по демонстрации опытов, проведении лабораторных работ (экспериментальных исследований) и практикума на кафедре ботаники № 62 приказ 21.03.17 № 55, а также правила безопасности № 144 во время проведения лабораторных занятий и демонстрации опытов на кафедре зоологии и

ботаники ФХБиГН ВГУ имени П.М. Машерова 15.04.2021 г. В издании использованы оригинальные рисунки авторов и рисунки из литературных источников.

Методические рекомендации служат для изучения следующих вопросов:

- основы культивирования микроорганизмов и стерилизации объектов;
- структурно-функциональные особенности организации клеток микроорганизмов;
- культуральные, физиологические и биохимические свойства различных групп микроорганизмов;
- специфика питания прокариот и характеристики различных типов питания, конструктивного и энергетического метаболизма;
- вклад микроорганизмов в круговорот веществ, химизм процессов трансформации биогенных элементов;
- биотехнологические процессы, протекающие при участии микроорганизмов.

Данное издание предназначено для студентов факультета химико-биологических и географических наук, обучающихся по специальностям «Биология и химия», «Биология», «Биоэкология». Также оно может быть полезно для углубленного изучения биологии, подготовки к олимпиадам и учащихся других специальностей, сталкивающихся по роду своей деятельности с микроорганизмами.

## **Раздел I**

# **СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ**

### **Лабораторная работа № 1. Устройство микробиологической лаборатории. Правила техники безопасности. Общие правила приготовления препаратов фиксированных микроорганизмов**

#### **Устройство микробиологической лаборатории**

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Под лабораторные комнаты отводят светлые, просторные помещения. Поверхность столов и пол всех лабораторных помещений покрывают легко моющимся материалом, а стены окрашивают в светлые тона. Большое значение играет правильная организация рабочего места: оно должно быть оптимально освещено и иметь все необходимое для проведения исследований. Рабочий стол устанавливают таким образом, чтобы свет падал на него сбоку или прямо. На столе должно быть только необходимое оборудование: штатив с реактивами и красителями, спички, горелка, колба с водой, бактериологические петли.

Кроме основного рабочего помещения лаборатория должна иметь комнату с термостатом для выращивания микроорганизмов, стерилизационную, где размещены автоклавы и сушильные шкафы, холодильную комнату, помещение для хранения культур микроорганизмов, моечную и т.д. Пересевы микроорганизмов осуществляют в боксах разных конструкций – от изолированных помещений до настольных камер (ламинаров), чистота атмосферы рабочего пространства в которых обеспечивается циркуляцией стерильного воздушного потока внутри камеры.

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. В ней не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Рабочие поверхности в помещении обеззараживают с помощью дезинфицирующих растворов. Также для этого можно использовать бактерицидные лампы в качестве источников ультрафиолетового излучения. Воздух в лаборатории очищают проветриванием.

Выполнение исследований в микробиологической лаборатории предполагает использование асептической техники. Асептика – совокупность методов и приёмов работы, направленных на создание безмикробных, стерильных условий для работы путём использования организационных мероприятий, активных обеззараживающих химических веществ, а также технических средств и физических факторов.

### **Правила техники безопасности при работе в микробиологической лаборатории**

1. Заходить и работать в лаборатории разрешается только в халате.
2. Запрещается вносить в лабораторию посторонние вещи. Особенно верхнюю одежду.
3. Запрещается приносить и принимать в лаборатории пищу.
4. Материал, изучаемый в лаборатории, рассматривается как заразный. Во время работы необходимо использовать приемы, исключающие контакт с заразным материалом.
5. Работать на одном и том же месте.
6. На рабочем месте должно быть только необходимое оборудование.
7. Зажигать спиртовку спичками. Использовать для этого зажигалку или другую горящую спиртовку запрещено.
8. Аккуратно и благоразумно использовать электрооборудование. Без разрешения преподавателя использовать электроприборы и химические реактивы запрещено.
9. Не соприкасаться с металлическими и другими предметами с проводами и контактными частями электросети.
10. Соблюдать правила безопасного обращения с химическими реактивами.
11. Соблюдать чистоту и опрятность при работе.
12. По окончании занятий рабочее место и оборудование привести в порядок. Инструменты и рабочее место обрабатывают дезинфицирующим раствором.
13. Уходя из лаборатории обязательно вымыть руки.
14. При случайном попадании биологического материала на стол его необходимо протереть дезинфицирующим средством.
15. Результаты работы заносят в журнал, в котором указывают название опыта, его цель, дату постановки и окончания, условия проведения, объект исследования, полученные результаты и сделанные выводы.
16. К работе в лаборатории учащиеся могут быть допущены только после прохождения инструктажа по технике безопасности.

### **Приготовление препаратов микроорганизмов**

Прежде, чем приступить к исследованию микроорганизмов, необходимо убедиться, что на рабочем месте находится только необходимое оборудование и реактивы. Рабочая поверхность стола должна быть покрыта материалом, который легко моется и дезинфицируется. На столе перед учащимся располагается спиртовка, кристаллизатор, сверху на котором находится препаратодержатель. Сбоку штатив с реактивами и красителями, штатив с бактериологической петлей и пробирками. Также для работы необходимы предметные и покровные стекла, культура исследуемых микроорганизмов.

Любой опыт с микроорганизмами начинают с отбора проб. На плотных и жидких питательных средах последовательность действий различается.

На плотной питательной среде микроорганизмы культивируют в пробирках и чашках Петри. В самом начале необходимо продезинфицировать бактериологическую петлю, которой будут отбирать микробиологический материал. Предварительно зажигают спиртовку. Петлю берут в правую руку, таким же образом, как ручку или карандаш, располагая ее между средним и указательным пальцами, придерживая сверху большим пальцем. Затем стерилизуют петлю прокаливанием (фламбированием): изначально вносят ушко и ожидают его покраснения в пламени, затем прокаливают стебелек и основание петли. Если плотная среда с микроорганизмами располагается в чашке Петри, левой рукой слегка ее приоткрывают, в образовавшееся пространство вносят простерилизованную петлю и прижимают петлю к верхней крышке чашки Петри 10–15 секунд. Это делается для того, чтобы предотвратить гибель микроорганизмов. После остужения, ушком петли прикасаются к микробиологическому материалу и слегка протягивают без нажима. Затем достают петлю из чашки Петри и выполняют необходимые манипуляции.

Если плотная питательная среда с микроорганизмами находится в пробирке, необходимо выполнить следующие действия. Пробирку берут в левую руку, мизинцем правой руки, в которой находится простерилизованная бактериологическая петля, достают пробку, обжигают горло пробирки в пламени спиртовки, ушко петли на несколько секунд прислоняют к стенке пробирки, а затем ушком прикасаются к исследуемому материалу и слегка протягивают без нажима. Достают петлю из пробирки, края пробирки и пробку обжигают в пламени и закрывают.

Из жидкой питательной среды пробы можно отбирать бактериологической петлей или пипеткой. Заранее простерилизованную пипетку берут за верхнюю часть и вводят в пробирку или колбу с питательной средой и исследуемыми объектами. Для отбора жидкой культуры вместе с пипеткой можно использовать резиновую грушу. При использовании автоматических пипеток используют сменные стерильные наконечники. Использованную пипетку помещают в дезинфицирующий раствор, бактериологическую петлю стерилизуют прокаливанием.

После отбора, пробы микроорганизмов используют для приготовления препаратов, чтобы изучить морфологические и тинкториальные особенности, или для посева – чтобы размножить микроорганизмы, накопить биомассу, изучить культуральные свойства.

## Лабораторная работа № 2. Простое окрашивание микроорганизмов

Фиксированные окрашенные препараты микроорганизмов позволяют определять морфологию, изучать особенности строения, выявлять наличие специфических структур и включений. Последовательность приготовления препаратов включает следующие этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксирование, окрашивание.

Для приготовления мазка первым действием прокалывают микробиологическую петлю и наносят ей каплю водопроводной воды из пробирки на предметное стекло. Далее снова прокалывают петлю и берут ей исследуемые организмы из питательной среды. Исследуемый материал вносят в каплю воды и размешивают. Полученную суспензию размазывают петлей на площади 1–2 см<sup>2</sup> максимально тонким слоем, чтобы мазок быстро высыхал. Правильно приготовленный мазок должен быть округлой или овальной формы, однородный по толщине, без гранул и вкраплений, полупрозрачный. Если микроорганизмы для изучения берут из жидкой питательной среды, каплю воды можно не наносить, а отбор пробы производить бактериологической петлей или пипеткой. После приготовления мазка петлю прокалывают, а пипетку помещают в дезинфицирующий раствор.

Высушивание мазка осуществляют при комнатной температуре или путем не сильного нагревания высоко над пламенем спиртовки. Следует избегать сильного нагревания, т.к. это может привести к коагуляции белков и деформации клеток.

Фиксация мазка может быть выполнена двумя способами. Первый – термический (фламбирование), используют чаще всего. Для этого предметное стекло с микроорганизмами (мазком вверх) проносят несколько раз над пламенем спиртовки через наиболее горячую часть пламени. Второй – химический, используют путем нанесения химических растворов на мазок или помещая препараты в раствор фиксаторов. Чаще всего для этих целей используют формалин, спирты, ацетон. Фиксация необходима для инактивирования микроорганизмов, лучшего прикрепления мазка к стеклу и лучшего окрашивания препарата.

После фиксации приступают к окрашиванию препарата. Для этого его располагают на препаратодержателе над кристаллизатором и наносят один либо несколько красителей на определенное время. Далее препарат промывают водой из колбы. Воду льют тонкой не сильной струей до того времени, пока стекающая с предметного стекла вода не станет полностью прозрачной. Затем препарат переворачивают, удаляют излишки воды, протирают фильтровальной бумагой, высушивают и микроскопируют.

Для окрашивания микроорганизмов применяют основные и кислые красители. В основных красящим веществом (хромофором) является катион, который связывается с кислыми компонентами клетки. К этой группе относятся генциановый фиолетовый, основной фуксин, метиленовый

синий, нейтральный красный, малахитовый зеленый, сафранин. Основные красители в микробиологии используются чаще. В кислых красителях красящим веществом является анион. Примерами этой группы служат эозин, кислый фуксин, эритрозин, нигрозин.

По количеству используемых красителей окрашивание подразделяется на простое и сложное (дифференцированное). В первом случае используют какой-либо один краситель – генциановый фиолетовый, фуксин или метиленовый синий. Во втором используют несколько красителей, один из которых является основным, а другие – дополнительные, также применяют различные обесцвечивающие вещества: кислоты, спирты, воду. С помощью сложного вещества выявляют специфические клеточные структуры, включения.

По механизму окрашивания выделяют красители позитивные и негативные. Позитивные красители непосредственно окрашивают препарат: клетки микроорганизмов, фрагменты субстрата. Негативные красители окрашивают пространство между клетками микроорганизмов, образуя фон, а сами клетки микроорганизмов они не окрашивают.

### Лабораторная работа № 3. Окраска микроорганизмов по Граму

Окраска по методу Грама – позволяет различать бактерии по молекулярной и химической организации клеточной стенки. Сущность его в том, что в клетках одних микроорганизмов образуется стойкое соединение генцианового фиолетового с йодом, которое не вымывается спиртом, а у других видов это соединение временное, вымывается спиртом. К первой группе относятся представители родов *Bacillus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* – это грамположительные бактерии. К грамотрицательным бактериям относятся следующие роды и виды прокариот: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Neisseria*, *Erwinia*. Данный метод окрашивания является одним из наиболее используемых и важных для дифференциации прокариот. Окраска по Граму включает следующие этапы:

1. На фиксированный мазок наносят генциановый фиолетовый (или сверху на препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги и на нее наносят краситель) на 1–2 минуты.
2. Сливают краситель и, не промывая препарат водой, наносят на него реактив Люголя на 1 минуту до почернения.
3. Сливают реактив Люголя, не промывая водой, на окрашенный препарат наносим 96%-ный спирт (или помещают предметное стекло в стакан со спиртом) на 20 секунд.
4. Мазок промывают водой.
5. На препарат наносят фуксин на 1–2 минуты, после чего промывают водой.

6. Препарат высушивают и микроскопируют под иммерсией.

Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый, грамотрицательные – в розово-красный цвет. Для окрашивания по Граму рекомендуется использовать суточные культуры, так как способность удерживать краситель зависит от физиологических свойств клетки.

#### **Лабораторная работа № 4. Окрашка капсулы бактерий.**

##### **Выявление цитоплазматических включений**

Многие бактерии при особых условиях культивирования образуют капсулу – слизистое образование, прочно связанное с клеточной стенкой, имеющее четко очерченные внешние границы. Капсулы различаются по толщине и химическому составу, не являются обязательными компонентами клетки прокариот. Капсулообразующие бактерии формируют колонии с гладкой, блестящей, слизистой поверхностью (S-колонии). Капсулы выполняют защитную функцию, могут являться фактором вирулентности, участвуют в транспорте веществ, в адгезии клеток к субстрату и запасании питательных веществ.



Рис. 1. Капсулы бактерий

Для выявления капсул используют методы негативного контрастирования.

##### **Метод Бури – Гинса:**

1. На предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина и вносят в нее бактериологической петлей культуру исследуемых бактерий.
  2. Рядом наносят каплю туши. Смешивают две капли и, протягивая ребром чистого предметного стекла по поверхности препарата, делают мазок.
  3. Мазок высушивают на воздухе и микроскопируют под иммерсией.
- На темном фоне видны розовые клетки, окруженные бесцветной капсулой.

### **Окраска цитоплазматических включений**

Внутрицитоплазматические включения прокариот подразделяются на активно функционирующие и продукты клеточного метаболизма. К первой группе относятся хлоросомы, фикобилисомы, карбоксисомы, аэросомы, магнитосомы – структуры, участвующие в фотосинтезе, фиксации углекислого газа и таксисах. Ко второй группе относятся запасные вещества: полисахариды, полифосфаты, липиды, полипептиды, отложения серы.

Волютин – полифосфат, является фосфор- и азотсодержащим резервным веществом. У прокариот (*Bacillus subtilis*, *Spirillum volutans*) локализован в цитоплазме, у эукариот (*Saccharomyces spp.*) – в вакуолях. Характерной особенностью волютина является метакромазия – приобретение цвета, отличного от красителя.

#### **Метод окраски волютина по Нейссеру:**

1. На фиксированный в пламени мазок наносят раствор метиленового синего по Нейссеру на 1–2 минуты.
2. Промывают препарат водой.
3. На мазок наносят раствор Люголя на 20–30 секунд.
4. Не промывая препарат водой, дополнительно наносят 2%-ный раствор везувина на 2–3 минуты.
5. Сливают краситель, промывают препарат водой, высушивают, микроскопируют с иммерсионной системой.

Цитоплазма окрашивается в желтый цвет, гранулы волютина – в темно-синий.

#### **Метод окраски волютина по Омелянскому:**

1. На фиксированный в пламени мазок наносят карболовый фуксин Циля на 0,5–1 минуту.
2. Сливают краситель, промывают препарат водой и наносят на него 1%-ный раствор  $H_2SO_4$  на 20–30 секунд.
3. Сливают кислоту, промывают мазок водой и наносят водный раствор метиленового синего на 20–30 секунд.
4. Промывают препарат водой, высушивают, микроскопируют под иммерсией.

Цитоплазма окрашивается в синий цвет, гранулы волютина – в красный.

#### **В клетках дрожжей волютин можно выявить следующим способом:**

1. На фиксированный мазок наносят метиленовый синий Леффлера на 10 минут.
2. Краситель сливают, промывают препарат и микроскопируют, используя иммерсионную систему.

Клетки имеют голубой цвет, зерна волютина – фиолетово-красный.

**Включения полисахаридной природы можно выявлять на прижизненных препаратах, используя раствор Люголя:**

1. На предметное стекло наносят каплю жидкой культуры микроорганизмов. Либо в каплю воды бактериологической петлей вносят микроорганизмы с плотной питательной среды и делают суспензию.

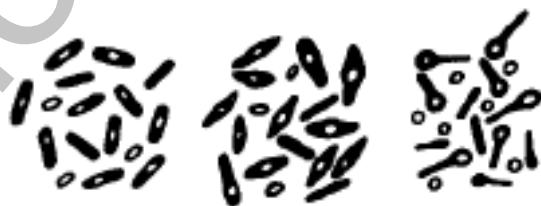
2. К капле суспензии добавляют каплю раствора Люголя.

3. Накрывают препарат покровным стеклом и микроскопируют.

Гликоген при окраске раствором Люголя легко выявляется у *Saccharomyces cerevisiae* и его гранулы имеют красно-коричневый цвет. Гранулы крахмалоподобного вещества – гранулезы окрашиваются в синий цвет и хорошо обнаруживаются у бактерий рода *Clostridium*.

**Лабораторная работа № 5. Окраска эндоспор бактерий.  
Окраска нуклеоида. Определение кислотоустойчивости бактерий**

Эндоспоры формируются внутри вегетативных клеток бактерий, имеющих клеточную стенку грамположительного типа. В клетке образуется одна эндоспора, которая может располагаться в центре, субполярно или полярно. Образование споры насчитывает несколько стадий, которые объединяют в три основных этапа: подготовительный, формирование и созревание. От вегетативных клеток эндоспоры отличаются повышенным содержанием гидрофобных аминокислот, дипикотиновой кислоты, катионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , низким уровнем метаболизма, меньшим содержанием ДНК, РНК и воды, а также повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям. Попадая в благоприятные условия споры прорастают, из них образуются вегетативные клетки. Кроме того, можно искусственно вызвать их прорастание путем кратковременного кипячения или нагревания. Основная функция эндоспор – перенесение неблагоприятных условий.



1                      2                      3

Рис. 2. Типы спорообразования у бактерий:

1 – бациллярный; 2 – клостридиальный; 3 – плектридиальный

Существует несколько способов выявления эндоспор, для этого могут быть использованы как простые, так и сложные методы окраски.

### **Окраска по методу Шефера – Фултона:**

1. Фиксированный мазок покрывают кусочком фильтровальной бумаги, на который наносят 0,5%-ный водный раствор малахитового зеленого и несколько раз нагревают в пламени спиртовки до появления паров.
  2. Убирают фильтровальную бумагу, промывают препарат водой и на 30 секунд наносят раствор фуксина (или 0,5%-ного сафранина).
  3. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют под иммерсией.
- Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетки – в красный.

### **Окраска по методу Пешкова:**

1. На фиксированный в пламени мазок наносят раствор метиленового синего. Предметное стекло берут пинцетом, нагревают над пламенем спиртовки и после закипания красителя удерживают препарат в таком положении 10–20 секунд.
  2. Предметное стекло кладут на препаратодержатель, дают ему остыть и промывают водой.
  3. Наносят на препарат на 30 секунд 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного или сафранина.
  4. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионной системой
- Споры окрашиваются в синий цвет, клетки – в красный.

### **Нуклеоид бактерий**

Нуклеоид – генетический аппарат прокариот, является аналогом ядра, упакованный в компактную структуру и расположенный в определенном участке цитоплазмы, не имеющий ядерной мембраны. Представляет собой кольцевую двухцепочечную бактериальную хромосому, в которой сосредоточена генетическая информация. В большинстве случаев, в бактериальной клетке находится один нуклеоид, но иногда в экспоненциальной фазе роста их число может достигать 20–25 копий (*Azotobacter chroococcum*). Также помимо кольцевой структуры у некоторых прокариот нуклеоид имеет линейную форму (*Streptomyces spp.*, *Rhodococcus fasciens*). Бактериальная хромосома состоит из ДНК, которая стабилизирована полиаминами, катионами  $Mg^{2+}$  и специфическими белками. Помимо нуклеоида, носителями ДНК в бактериальных клетках являются IS-элементы, транспозоны, плазмиды. Репликация ДНК у бактерий осуществляется по полуконсервативному механизму.

Выявление нуклеоида – трудоемкий процесс, так как одновременно с нуклеоидом могут окрашиваться другие компоненты бактериальной клетки. Довольно хорошо нуклеоид окрашивается в клетках *Azotobacter chroococcum*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*.

### **Метод Романовского – Гимзе:**

1. Мазок суточной культуры высушивают на воздухе и фиксируют метанолом или жидкостью Карнуа в течение 5 минут.
  2. После этого раствор опускают на 2–3 минуты в 1М раствор HCl.
  3. Затем препарат промывают водой, помещают в 1%-ный раствор формалина и наносят на мазок раствор основного фуксина на 1–2 минуты.
  4. Промывают препарат водой, высушивают и микроскопируют, пользуясь иммерсионной системой.
- Цитоплазма окрашивается в розовый, нуклеоид – в ярко-малиновый цвет.

### **Окраска кислотоустойчивых бактерий**

Для некоторых прокариот (*Mycobacterium*, *Actinomycetales*) характерно такое свойство, как кислотоустойчивость. Оно заключается в способности клеток трудно воспринимать красители и сохранении окраски после обработки кислотой. Кислотоустойчивость связана с особым химическим составом клеточных стенок: высоким содержанием в них сложных липидов и миколовых кислот.

### **Метод Циля – Нильсена:**

1. На фиксированный в пламени мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, на который наносят раствор карболового фуксина по Цилю. Мазок с красителем 2–3 раза прогревают до появления паров, располагая его в пламени спиртовки (около 5 минут). Нельзя допускать закипание красителя, при образовании паров и подсыхании фуксина добавляют несколько капель раствора.
2. Препарату дают остыть, промывают водой.
3. Окрашенный мазок помещают в стакан с раствором 5%-ной  $H_2SO_4$  или 3%-ной HCl 2–3 раза, не задерживая в кислоте.
4. Препарат промывают водой и наносят на него метиленовый синий Леффлера на 3–5 минут.
5. Препарат промывают водой, высушивают микроскопируют с иммерсией.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, некислотоустойчивые – в синий.

## **Лабораторная работа № 6. Приготовление прижизненных препаратов и определение подвижности микроорганизмов.**

Прижизненные препараты микроорганизмов используются для изучения морфологии, способов и скорости размножения, особенностей спорообразования, выявления подвижности, наблюдения реакции на воздействие разнообразных химических и физических факторов. При изучении препаратов данной группы возможно использование «прижизненных» красителей – метиленового синего, нейтрального красного в очень низких концентрациях (0,001–0,0001%). Препараты живых клеток рассматривают, как правило, без использования иммерсионной системы. После окончания работы, изученные препараты помещают в дезинфицирующий раствор.

### **Препарат «раздавленная капля»:**

1. На предметное стекло наносят каплю воды.
2. С плотной питательной среды берут исследуемую культуру, вносят ее в каплю воды и эмульгируют. Если микроорганизмы находятся в жидкой питательной среде, наносят каплю культуры на предметное стекло без предварительного добавления капли воды.
3. Накрывают препарат предметным стеклом, избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

### **Препарат «висячая капля»:**

1. Наносят каплю суспензии изучаемых микроорганизмов на покровное стекло.
2. Берут предметное стекло с лункой и обмазывают края углубления вазелином (для плотного прилегания, создания влажной камеры и предохранения от высыхания), избегая попадания вазелина в лунку.
3. Переворачивают покровное стекло каплей вниз и накладывают его на предметное стекло с лункой таким образом, чтобы капля исследуемой суспензии располагалась над центром лунки, не растекаясь и нависая над углублением.

### **Препарат «отпечаток»:**

1. На плотную питательную среду с микроорганизмами кладут стерильное покровное стекло и слегка придавливают его бактериологической петлей или пинцетом, стараясь не сдвигать.
2. Покровное стекло отпечатком вниз помещают в каплю воды или красителя.
3. Для приготовления препарата можно использовать предметное стекло, если касаться поверхности колонии или газона предметным стеклом.

### **Препарат «агаровая пленка»:**

1. На стерильное предметное стекло наносят 0,2 – 0,3 мл агаризованной питательной среды и распределяют ее тонким слоем.
2. После застывания питательной среды бактериологической петлей или пастеровской пипеткой в нее вносят суспензию исследуемых микроорганизмов.
3. Сверху помещают покровное стекло, лишнюю питательную среду убирают.
4. Для создания благоприятных условий щели между предметным и покровным стеклом заливают воском или парафином либо инкубируют полученный препарат во влажной камере (чашка Петри со слоем мокрой фильтровальной бумаги).
5. На таком препарате изучают способы размножения, процессы развития, так как не нарушается естественное расположение растущих клеток.

### **Определение подвижности микроорганизмов:**

1. Стерильной бактериологической петлей вносят изучаемые микроорганизмы уколом в пробирку с полужидкой агаризованной питательной средой.
2. Пробирку закрывают стерильной пробкой и помещают в термостат на 24–48 часов.
3. Если рост микроорганизмов наблюдается только по линии укола, значит, они неподвижны. Подвижные бактерии будут распределены шире линии укола, выходят за пределы этой линии, вызывают диффузное помутнение питательной среды.

## Раздел II

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ

### Культивирование и способы пересева микроорганизмов

На современном этапе развития микробиологии возможно культивирование менее 0,1% от общего числа микроорганизмов (Нетрусов, 2006), так как многие прокариоты являются симбионтами других организмов и обитают в специфических условиях, которые не легко воссоздать в лаборатории.

Выращивание микроорганизмов при определенных условиях в лаборатории – культивирование. Культивирование при определенной температуре называется инкубированием. Для инкубирования используют термостаты. Для культивирования строгих анаэробов используют анаэроостаты – приборы, создающие бескислородные условия. Выделяют два типа культивирования: периодическое (статическое) и непрерывное (проточное).

### Классификация питательных сред

Культивирование микроорганизмов осуществляют на питательных средах. Питательные среды различаются по ряду признаков:

#### По химическому составу:

- натуральные (настой сена, фруктовые соки, молоко);
- полусинтетические (растительный экстракт с добавлением аминокислот и витаминов);
- синтетические (содержат химические соединения в точно указанных концентрациях).

#### По консистенции:

- жидкие (используют для накопления биомассы, сохранения культуры, исследования физиологии и биохимии);
- полужидкие (используют для изучения подвижности, культивирования микроаэрофилов);
- плотные (применяют для выделения чистых культур и описания колоний, сохранения культуры);
- сыпучие или сухие (находят применение в промышленной микробиологии для получения физиологически ценных соединений, среды удобны для хранения и транспортировки).

#### По назначению:

- обычные (простые) – для культивирования большинства микроорганизмов (МПА – мясопептонный агар);
- селективные – применяют для выделения определенной группы микроорганизмов из естественных условий и получения накопительной

культуры, менее пригодны для развития других (среда Эшби – безазотистая питательная среда для культивирования азотфиксаторов);

- дифференциально-диагностические – позволяют отличить одни микроорганизмы от других на основе биохимических и физиологических особенностей (среда Эндо для выявления энтеробактерий).

### **Способы стерилизации**

**Стерилизация** – полное уничтожение патогенных и сапрофитных форм микроорганизмов в материалах (Павлович, 2013). Питательные среды, инструменты, лабораторная посуда стерилизуются для проведения микробиологических исследований, чтобы не допустить развития посторонних организмов. К термическим методам стерилизации относят прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация, автоклавирование, дробная стерилизация (тиндализация), кипячение, пастеризация. Среди методов холодной стерилизации применяются фильтрование, обработка химическими веществами, ультрафиолетовым и другими видами излучений.

**Прокаливание и обжигание в пламени** (фламбирование) – применяется для обеззараживания бактериологических петлей, шпателей, ножниц, термоустойчивых материалов.

**Сухожаровая стерилизация** осуществляется в специальных сухожаровых шкафах. Основана на использовании сухого горячего воздуха температурой 160–170 °С в течение 1–2 часов. Применяется для обеззараживания лабораторной посуды, пипеток и пробирок.

**Автоклавирование** – стерилизация насыщенным паром под давлением – наиболее надежный и часто применяемый способ очистки от микроорганизмов. Данный способ основан на одновременном воздействии высокой температуры и давления водяного пара, что обеспечивает особую эффективность этого процесса. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся котлах – автоклавах. Таким способом стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты. Надежной стерилизации достигают нагреванием до 121 °С, избыточном давлении 1,0 атм в течение 15–45 мин.

**Дробная стерилизация** (тиндализация) – способ обеззараживания питательных сред, портящихся при температурах выше 100 °С. В этом случае питательную среду нагревают до 100 °С и выдерживают эту температуру около 10 минут. Такие условия приводят к гибели вегетативных клеток, в питательной среде могут сохраниться только эндоспоры. После остывания питательную среду помещают в термостат при температуре 30 °С, что приводит к прорастанию спор. Спустя некоторое время, питательную среду вновь нагревают до кипения, чтобы уничтожить проросшие споры. Этот цикл повторяют 3–4 раза.

**Кипячение** – способ обеззараживания лабораторной посуды, инструментов, мембранных фильтров путем погружения в кипящую воду на 30–60 минут.

**Пастеризация** относится к частичной или неполной стерилизации. Заключается в однократном нагревании при 55–65 °С в течение часа или при 70–80 °С за 5–10 минут. Приводит к гибели вегетативных клеток, применяется для обеззараживания продуктов питания с сохранением их вкусовых качеств.

**Стерилизация фильтрованием** применяется по отношению к веществам, не выдерживающим термической обработки. В качестве фильтров используют мелкопористые материалы, задерживающие клетки микроорганизмов. Для пропускания раствора через фильтр необходимо давление или вакуум.

Химические вещества, используемые для стерилизации, должны обладать бактерицидным действием. Это могут быть вещества различной химической природы: соли тяжелых металлов, галогены, спирты, перекиси, фенолы. При газовом методе стерилизации чаще всего используют невоспламеняющиеся смеси этилена с диоксидом углерода и хладонами, а при стерилизации растворами – перекись водорода, глутаровый альдегид, надуксусную и надмуравьиную перкислоты.

**Стерилизация облучением** используется для очистки помещений, оборудования, некоторых материалов. Используются ультрафиолетовые лампы с длиной волны 250–270 нм. Также может применяться рентгеновское и  $\gamma$ -облучение для стерилизации больничных помещений, препаратов, оборудования и материалов.

### **Типы культур микроорганизмов.**

#### **Способы выделения чистой культуры**

В отношении микроорганизмов выделяют следующие типы культур: смешанные, накопительные, чистые.

Смешанные культуры – культуры микроорганизмов, включающие два и более вида, встречаются в естественных условиях обитания, различаются качественным и количественным составом.

Накопительные культуры – культуры, в которых преобладают организмы определенной экологической группы. Например, анаэробы в глубоких слоях почвы.

Чистая культура – культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида. Именно чистые культуры бактерий используют для изучения цитологических, физиологических и биохимических особенностей. Однако в естественных условиях микроорганизмы представляют собой многовидовые сообщества – смешанные культуры, из которых отбирают определенные виды.

Выделение чистой культуры включает следующие этапы: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и определение ее чистоты.

Получение накопительной культуры предполагает создание селективных условий, предложенных С.Н. Виноградским, которые стимулируют развитие одних и подавляют развитие других групп микроорганизмов. Из мест обитания, в которых живут определенные микробы, делают посев на подготовленную селективную среду. Для этого могут быть использованы физические, химические и биологические методы. К физическим относятся: использование освещения (для получения культур цианобактерий), инкубирование при высокой или низкой температуре (для получения культур термо- или психрофилов), применение пастеризации (для выделения спорообразующих бактерий). Создание селективных условий химическими методами включает в себя применение кислородных или бескислородных условий (для выращивания аэробов или анаэробов), поддержание pH питательной среды на определенном уровне (для культивирования ацидофилов, алкалофилов или нейтрофилов), использование безазотистых питательных сред (для получения культуры азотфиксаторов) или использование  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода (для микроорганизмов-автотрофов), применение антибиотиков для подавления роста определенных микробов (пенициллин в концентрации 0,2–100 мкг/л для накопления грамотрицательных бактерий). К биологическим методам относятся получение накопительных культур с использованием заражения подопытных животных (выделение патогенных микроорганизмов), выращивание одних бактерий в качестве субстрата для поселения или хозяина для других (бактерии *Bdellovibrio* паразитируют на представителях семейства *Enterobacteriaceae*).

Чаще всего, получение накопительной культуры требует применения комплекса различных методов. Например, для получения культуры пурпурных серных бактерий необходимо создать анаэробные условия, в качестве источника энергии использовать солнечный свет, вводить  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода и поддерживать высокую концентрацию сульфида серы.

Признаками развития накопительной культуры является помутнение среды, появление пленки, осадка, образование пигментации, выделение газов. После получения накопительной культуры переходят к выделению чистой культуры. Для получения чистой культуры аэробных микроорганизмов используют рассев шпателем или рассев петлей.

Рассев шпателем. На плотную агаризованную питательную среду наносят определенный объем накопительной культуры и распределяют ее по поверхности среды стерильным шпателем, вращая чашку Петри, после чего закрывают ее крышкой. Далее шпатель не стерилизуют, а быстро переносят его в новую чашку, проводят им по новой питательной среде и закрывают чашку крышкой. Аналогичные действия проводят для третьей чашки и стерилизуют шпатель. Ставят чашки инкубироваться и спустя какое-то время проводят учет микроорганизмов. Как правило, в первой чашке наблюдается сплошной рост, а в третьей формируются изолированные колонии. Эти колонии отбирают петлей и пересевают для последующего анализа.

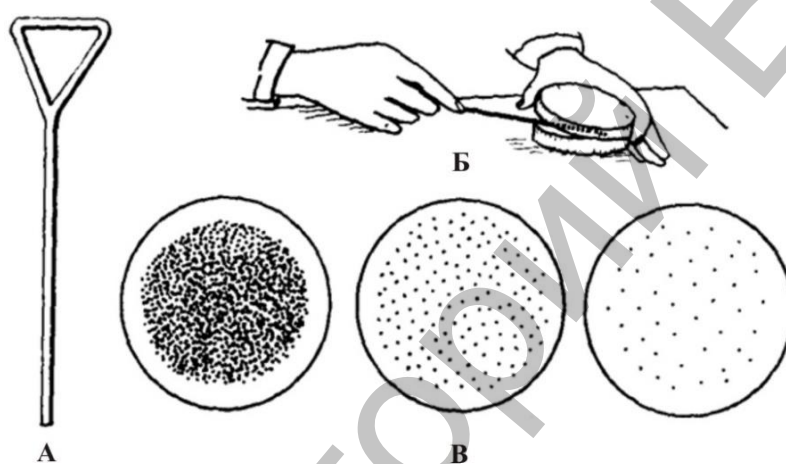


Рис. 3. Рассев культуры микроорганизмов шпателем:  
 А – шпатель Дригальского; Б – рассев;  
 В – рост микроорганизмов после посева

Рассев петлей (метод истощающего штриха). Простерилизованной бактериологической петлей отбирают микроорганизмы из накопительной культуры и проводят ей по поверхности агаризованной питательной среды в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым штрихом (Б, В, Г) петлю прокалывают. После посева чашку инкубируют в термостате, после чего проводят анализ роста микроорганизмов. На первых штрихах наблюдаются сплошные линии роста, на штрихах В и Г появляются изолированные колонии, которые в дальнейшем пересевают и используют для изучения.

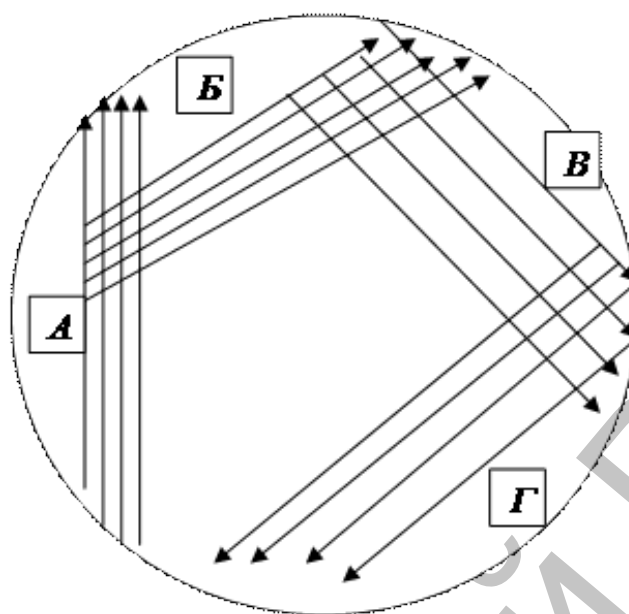


Рис. 4. Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Чистота полученной культуры микроорганизмов проверяется несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле оценивают рост микроорганизмов на поверхности скошенного агара – если рост неоднороден по линии нанесения, скорее всего культура загрязнена и требует дополнительной очистки. Под микроскопическим контролем понимают приготовление фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов – клетки, принадлежащие одному виду должны быть однородными по морфологии и окрашиванию. Но следует учитывать, что некоторые виды бактерий являются плеоморфными и грамвариабельными. Третий способ контроля чистоты культуры – высеивание на соответствующие питательные среды – определяет возможность роста микроорганизмов на средах с различными источниками и концентрациями химических элементов. Отсутствие или однородность характера роста колоний является свидетельством чистоты выделенной культуры.

## Лабораторная работа № 7. Посев и пересев микроорганизмов

Внесение культуры исследуемого микроорганизма из исследуемого материала в стерильную питательную среду называется посевом. Пересевом называется перенос выращенных микроорганизмов из одной питательной среды в другую. Эти действия необходимо проводить, используя стерильные инструменты рядом с пламенем горелки. В зависимости от целей и типа питательных сред выделяют различные методики посева, но все они имеют схожие начальные этапы. В самом начале мы берем в правую руку бактериологическую петлю и прокаливаем ее. Затем мы берем пробирку с культурой микроорганизмов в левую руку, держим ее горизонтально таким образом, чтобы хорошо видеть расположение объектов изучения. После этого, мизинцем правой руки мы достаем пробку из пробирки, прогреваем края пробирки, вводим внутрь простерилизованную бактериологическую петлю, на несколько секунд прижимаем петлю к стенке пробирки для охлаждения и отбираем какое-то количество микроорганизмов. Далее достаем петлю из пробирки, прогреваем над спиртовкой горлышко пробирки, пробку, закрываем пробирку и ставим ее в штатив. Следующее действие – внесение микроорганизмов петлей на новую питательную среду. В конце необходимо простерилизовать бактериологическую петлю, чтобы удалить оставшиеся бактерии.

**Посев на скошенный агар.** Отобранные микроорганизмы микробиологической петлей вносят ко дну пробирку, и слегка прикасаясь к среде, проводят зигзагообразную линию снизу вверх. Данный способ используется для накопления биомассы, описания характера роста (сплошной, диффузный, перистый, однородный, скудный) и оптических свойств микробов (цвет, консистенция).

**Посев на поверхность питательной среды в чашках Петри.** Используется для накопления биомассы, описания колоний, выделения чистых культур, идентификации микроорганизмов. Посев можно осуществлять бактериологической петлей, микробиологическим шпателем Дригальского, а также методом реплик. В первом случае мы отбираем петлей культуру микроорганизмов и наносим ей штрихи по поверхности питательной среды (рис.3). Вторым способом используется для посева микробов из жидкой культуры: наносят определенный объем содержащей бактерии суспензии и распределяют ее стерильным шпателем по поверхности агаризованной питательной среды, при этом вращая чашку Петри (рис.4). При посеве методом реплик используют определенную ткань (бархат с коротким жестким ворсом) – ее прижимают к среде с микроорганизмами, после чего прикладывают к стерильной питательной среде. В конце каждого из способов закрывают чашку Петри крышкой, и помещают чашки с посевами крышкой вниз.

**Метод глубинного посева.** Используется для культивирования микроаэрофильных и факультативно анаэробных микроорганизмов. Для этого

в пробирки разливают питательную среду, стерилизуют, затем нагревают на водяной бане до температуры 48–50 °С, открывают пробку, прогревают края пробирки над спиртовкой и вносят стерильной пипеткой определенный объем суспензии микроорганизмов. Перемешивают содержимое, вращая пробирку между ладонями. Затем открывают пробирку, прогревают ее края над пламенем спиртовки и выливают питательную среду в приготовленную чашку Петри. Дают питательной среде застыть и помещают в термостат крышкой вниз.

**Посев уколом.** Осуществляют в полужидких средах (0,1–0,4% агара) для культивирования микроаэрофильных микроорганизмов, хранения культур, изучения подвижности. Для этого бактериологическую петлю с микробами вносят в пробирку и вводят в центральную часть столбика с питательной средой, после чего прогревают края пробирки, пробку, закрывают пробирку и ставят в термостат.

При посеве в жидкую питательную среду отбирают микроорганизмы простерилизованной бактериологической петлей или пипеткой их вносят в новую жидкую питательную среду. Культивируя микробы таким способом отмечают наличие пигментации, образование газов, характер осадка, степень помутнения, формирование пленки на поверхности.

### **Лабораторная работа № 8. Описание колоний микроорганизмов**

Колония – скопление клеток одного вида микроорганизмов, выросшее из одной клетки. Для характеристики колоний на поверхности плотной питательной среды учитывается ряд признаков:

1. Размер (диаметр) колонии в миллиметрах (10 мм и более – крупная, от 1 до 10 мм – средняя, не более 1 мм – точечная);
2. Оптические свойства (прозрачная, просвечивающая, непрозрачная, блестящая, матовая, флуоресцирующая);
3. Цвет или пигментация, выделение цвета в субстрат;
4. Форма (рис. 5);
5. Профиль (рис. 6);
6. Форма края (рис. 7). Для рассмотрения формы края использовать микроскоп с малым увеличением;
7. Поверхность (гладкая, неровная, шероховатая, исчерченная, гранулированная и т.д.);
8. Консистенция (определяется прикосновением петлей: мукоидная (слизистая), вязкая, маслянистая, сухая, тянущаяся);
9. Структура (рис. 8).

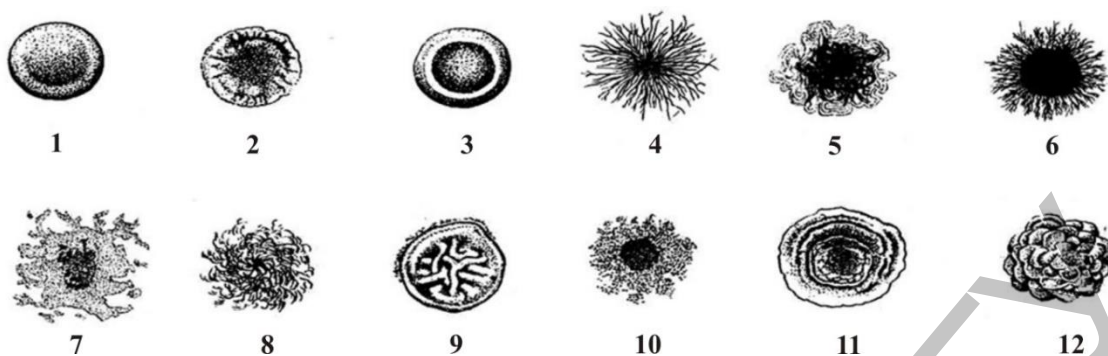


Рис. 5. Форма колоний:

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



Рис. 6. Профиль колоний:

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

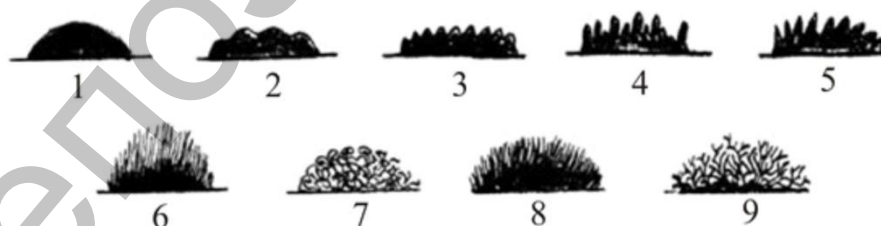


Рис. 7. Характер края колоний:

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

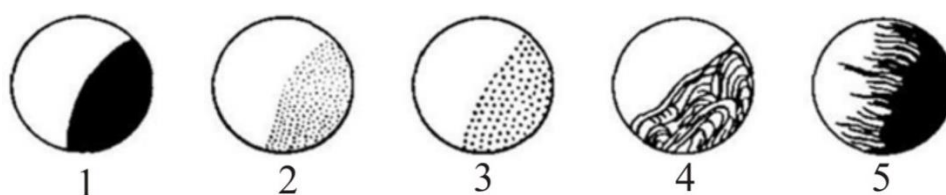


Рис. 8. Структура колоний:

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

### Лабораторная работа № 9. Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов

К физиолого-биохимическим свойствам микроорганизмов относят способность расти на питательных средах различного состава и вызывать трансформацию веществ, входящих в состав сред. Также к данным свойствам относится способность синтезировать определенные ферменты и антибиотики, использовать различные источники углерода, азота, серы, отношение к молекулярному кислороду.

Производство гидролитических ферментов в настоящее время является важным направлением биотехнологии. Наиболее широкое применение получили пептидогидролазы (протеазы) и ферменты, расщепляющие гликозидные связи (амилазы, целлюлазы). Ферменты используются прежде всего в текстильной, целлюлозно-бумажной, пищевой, фармацевтической, химической промышленности (при производстве моющих средств), в сельском хозяйстве (в качестве кормовых добавок, ветеринарных препаратов).

**Получение культур бактерий, способных к выделению гидролитических ферментов.** Источником микроорганизмов, способных к образованию протеолитических, амилолитических и целлюлолитических ферментов, могут служить подгнившие фрукты и овощи, почва с растительными остатками. Образец весом 30–40 г вносят в стерильную колбу объемом 250 мл, куда добавляют 40–50 мл стерильного физиологического раствора. Колбу 10 с интенсивно встряхивают, суспензии дают отстояться 30 мин. Далее для получения накопительных культур следует использовать селективные (элективные) агаризованные среды, которые содержат субстрат для выявления определенного фермента. Ферментативную активность можно обнаружить по образованию вокруг колоний продуцентов зон просветления, которые являются результатом гидролиза субстрата (например, гидролиза белков молока), либо зон, обнаруживаемых при колориметрической реакции (например, реакции на крахмал с реактивом Люголя).

Для выделения бактерий, способных к выделению протеолитических ферментов производится посев на минимальную среду, содержащую

солевой концентрат 5А как источник макро- и микроэлементов, с добавлением обезжиренного молока в конечной концентрации 0,7% в качестве единственного источника углерода.

Чтобы выделить бактерии, способные к выделению амилаз, посев производится на минимальную агаризованную среду, в качестве единственного источника углерода содержащую крахмал в конечной концентрации 0,05%.

Чтобы выделить бактерии, способные к образованию целлюлаз, посев производят на минимальную среду, которая содержит карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) в конечной концентрации 0,05% в качестве единственного источника углерода.

Для приготовления 400 мл минимальной среды необходим солевой концентрат 5А – 80 мл, расплавленный 2% водный агар – 300 мл. Объем доводят до 400 мл стерильной дистиллированной водой.

*Солевой концентрат 5А*

$K_2HPO_4$  – 52,5 г

$KH_2PO_4$  – 22,5 г

$(NH_4)_2 SO_4$  – 5,0 г

Цитрат натрия · 2H<sub>2</sub>O – 2,5 г

Вода дистиллированная до 1000 мл

После автоклавирования добавляют 5 мл стерильного 1 М раствора  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  на 1 л концентрата.

Посев производят с помощью стерильного шпателя, последовательно используя три чашки Петри. На поверхность среды в первой чашке стерильной пипеткой наносят 0,1 мл исследуемой суспензии и распределяют ее с помощью шпателя. Чашку накрывают крышкой. Далее шпатель не стерилизуют, а быстро переносят его во вторую чашку, где проводят им по новой питательной среде. Затем чашку накрывают крышкой, а шпатель переносят в третью чашку, повторяя указанные выше действия. После инкубирования в течение 1–3 дней при 28 °С чашки просматривают и отбирают для дальнейшей работы 4–5 морфологически различающихся типов колоний. Обычно на первой чашке наблюдается сплошной рост микроорганизмов, а на второй и третьей – рост изолированных колоний.

Отобранные колонии засевают методом истощающего штриха на среды такого же состава, как и для получения соответствующих накопительных культур.

**Определение гидролитической активности выделенных микроорганизмов. Целлюлолитическая активность.** Чашку с выросшими клонами заливают 1% водным раствором красителя Конго красного на 20 мин (краситель связывается с целлюлозой), затем краситель сливают, чашки промывают 8% водным раствором NaCl (для вымывания красителя из агара). О наличии целлюлолитической активности судят по образованию зон просветления вокруг колоний.

**Протеолитическая активность.** Выделенные ранее культуры засевают в чашки Петри на среду того же состава и инкубируют в течение суток при 28 °С. Показателем протеолитической активности служат прозрачные зоны гидролиза белков молока вокруг колоний.

В качестве субстратов для определения протеаз также может быть использован желатин или казеин. В первом случае в пробирки с желатинсодержащей питательной средой уколом засевают микроорганизмы и инкубируют несколько суток. Достают пробирки и отмечают отсутствие или наличие разжижения желатина. Если желатин разжижается, указывают характер процесса (кратеровидное, реповидное, мешкообразное, воронковидное, послойное, пузыревидное). Во втором случае готовят полноценную плотную питательную среду с добавлением молока и засевают на ее поверхность микроорганизмы медальонами. Инкубируют 3–5 суток и анализируют результаты. Если вокруг медальонов микроорганизмов образуются зоны просветления – для них характерна протеолитическая активность в отношении казеина.

**Амилолитическая активность.** Выделенные ранее культуры медальонами засевают в чашки Петри на среду, содержащую крахмал, и инкубируют в течение суток при 28 °С. После чего на среду наносят реактив Люголя: вокруг колоний микроорганизмов, гидролизующих крахмал, синее окрашивание не образуется.

**Выявление каталазы.** На чистое предметное стекло при помощи бактериологической петли наносят небольшое количество микроорганизмов (объемом не более спичечной головки). Затем к пробе добавляют каплю трехпроцентного раствора перекиси водорода. Образование пузырьков газа свидетельствует о наличии перекиси.

**Тест Грегерсена.** Позволяет определять грампринадлежность бактерий. На предметное стекло с помощью бактериологической петли наносят небольшое количество микроорганизмов. Далее к пробе добавляют каплю трехпроцентного гидроксида калия, затем ресуспензируют микроорганизмы в капле 5 – 10 секунд. После этого определяют вязкость суспензии: погружают в каплю петлю и медленно ее поднимают. Если образуется тонкая тянущаяся слизистая нить длиной в несколько сантиметров – бактерии имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Если петля отрывается от капли и слизистой нити не образуется – бактерии грамположительны.

**Окислительное (ферментативное) сбраживание углеводов (О/Ф тест).** Тест позволяет определять способность микроорганизмов

расщеплять углеводы: окислительным (используя кислород) или ферментативным (бескислородным) путем, либо двумя путями одновременно. Для опыта необходимо три пробирки, в которых находится простерилизованная полужидкая питательная среда с глюкозой и индикатором. Одна пробирка служит для контроля. В две оставшиеся стерильной бактериологической петлей уколом засевают микроорганизмы. В одну из засеянных пробирок сверху добавляют вазелиновое масло, создавая бескислородные условия. Пробирки инкубируют сутки. Затем проводят учет результатов, сравнивая цвет засеянных пробирок с цветом контрольной пробирки.

**Использование соединений углерода.** Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода. Изучение этой способности можно осуществлять на синтетических средах, или на средах Гисса, которые содержат различные источники углеводов (глюкоза, лактоза, мальтоза и др.). Опыт можно проводить по-разному. Первый способ – засеять бактерии уколом в пробирки с полужидкой средой, инкубировать несколько суток и затем сравнить результаты с характером роста в контрольной среде. Данный способ также позволяет обнаружить в результате расщепления углеводов образование газа (в виде пузырей внутри или пены на поверхности) и кислот (по изменению цвета индикатора из-за изменения pH). Второй способ – в чашке Петри на плотную питательную среду, разделенную на сектора, засеять штрихом или медальонами различные микроорганизмы (один вид в один сектор). Чашку Петри инкубируют несколько суток, а затем анализируют результаты, по интенсивности роста различных микроорганизмов, по сравнению с ростом на контрольной среде.

После получения результатов опытов вносят данные в таблицу 1.

Таблица 1 – **Физиолого-биохимические особенности бактерий**

| Название вида | Наличие каталазы | Грампринадлежность              | O/F тест      | Наличие амилазы | Наличие протеазы |
|---------------|------------------|---------------------------------|---------------|-----------------|------------------|
|               | «+»/«-»          | G <sup>+</sup> / G <sup>-</sup> | «+, -»/«+, -» | «+»/«-»         | «+»/«-»          |

## Лабораторная работа № 10. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

Антибиотики подавляют развитие и вызывают гибель микроорганизмов. Мишенями их действия являются специфические структуры или процессы в клетке: муреин и процессы синтеза клеточной стенки, 70S рибосомы и процессы синтеза белка, синтез нуклеиновых кислот и процессы метаболизма. Также следует отметить, что для микроорганизмов характерен процесс возникновения резистентности к антибиотическим веществам. В основе его лежат следующие механизмы: врожденная резистентность, образование биопленок, ферментативная инактивация, модификация мишеней, активное выведение, точковые мутации, горизонтальный перенос генов.

Чаще всего, чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяют при помощи метода бумажных дисков, пропитанных растворами антибиотиков, и методом серийных разведений антибиотика.

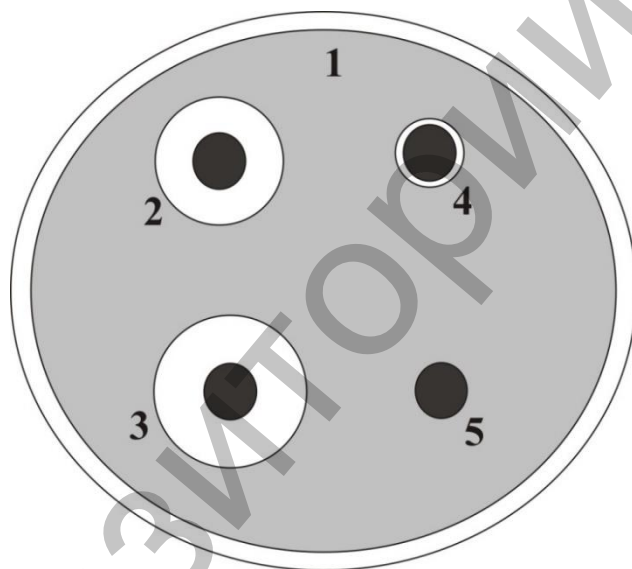


Рис. 9. Определение чувствительности к антибиотикам методом бумажных дисков:

- 1 – галлон тест-культуры; 2, 3 – зоны задержки роста, вокруг дисков с антибиотиками, вызывающими высокую чувствительность;  
4 – зона задержки роста, вокруг диска антибиотика, вызывающего слабую чувствительность; 5 – диск с антибиотиком, не действующий на тест-организм

Первый метод основан на диффузии антибиотиков в питательную среду и использовании стандартных дисков с антибиотиками с подобранными концентрациями. На плотную питательную среду наносят 0,1 мл суспензии микроорганизмов и распределяют их стерильным шпателем. После этого стерильным пинцетом на одинаковом расстоянии друг от друга на засеянную питательную среду помещают стандартные

бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Чашку Петри ставят в термостат и инкубируют в течение суток. Затем производят учет результатов. Если диаметр зоны задержки роста составляет 25–30 мм – значит микроорганизм обладает высокой чувствительностью к антибиотику, зона задержки роста размером 10 мм и менее свидетельствует о слабой чувствительности тест-организма.

Метод серийных разведений антибиотика в жидкой питательной среде позволяет найти минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика по отношению к изучаемому микроорганизму. Для опыта необходимо приготовить несколько пробирок, в каждую из них добавить по 2 мл жидкой питательной среды. Также необходима готовая или приготовленная суспензия антибиотика с известной концентрацией (200 – 500 мкг/мл). К первой пробирке добавляем 2 мл антибиотика и перемешиваем смесь. Затем стерильной пипеткой отбираем из первой пробирки 2 мл и добавляем во вторую, тем самым снижая концентрацию антибиотического вещества в два раза во второй пробирке по сравнению с первой. Это же действие проделываем для третьей и четвертой пробирки. Пятая пробирка – контроль. После к каждой пробирке добавляем 0,1 мл суспензии исследуемой культуры микроорганизмов. Пробирки перемешивают, закрывают стерильными пробками и помещают в термостат на сутки, после чего проводят анализ результатов. Помутнение среды указывает на развитие и высокую численность микроорганизмов. Сначала просматривают контрольную пробирку, чтобы по помутнению среды определить наличие роста тест-объекта, затем пробирки с разными концентрациями антибиотика. Минимальная ингибирующая концентрация антибиотика будет в пробирке, которая остается прозрачной и характеризуется наименьшим содержанием антибиотического вещества.

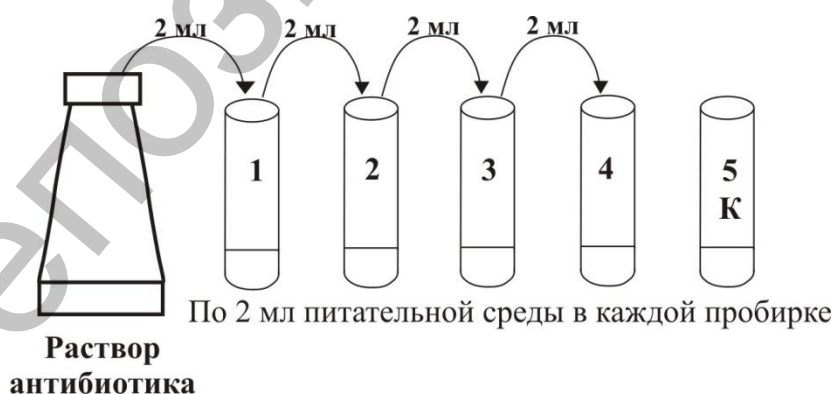


Рис. 10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотику методом серийных разведений.

После получения результатов опытов вносят данные в таблицу 2:

Таблица 2 – **Определение минимальной ингибирующей концентрации антибиотика**

| Концентрация антибиотика              | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>n</sub> | Контроль |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| Наличие или отсутствие микроорганизма | «+»/«-»        | «+»/«-»        | «+»/«-»        | «+»/«-»        | «+»/«-»  |

### **Лабораторная работа № 11. Определение антибиотической активности микроорганизмов**

Антибиотики – низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, растений и животных или их модификации, задерживающие рост либо полностью подавляющие развитие других микроорганизмов. Особенностью этих веществ является избирательность действия и высокая биологическая активность. Примерно половина известных антибиотиков синтезируются штаммами, принадлежащими к актиномицетам, главным образом к роду *Streptomyces*. Способность синтезировать и выделять антибиотики в окружающую среду лежит в основе антагонизма – взаимоотношения видов, при которых микроорганизмы-продуценты антибиотиков подавляют рост других и получают преимущество в заселении субстратов.

Для определения антибиотических свойств микроорганизмов существуют различные методы. Они основаны на выделении чистой культуры микроорганизма, который синтезирует антибактериальные вещества и подавляет рост тест-организмов вокруг себя, формируя зоны просветления.

В качестве продуцентов антибиотиков могут использоваться актиномицеты, обитающие в почве. На питательных средах они растут медленно. Поэтому концентрация сахаров в среде для их выделения должна быть максимальной, либо следует использовать трудноутилизируемый источник углерода, чтобы предотвратить быстрый рост бацилл и псевдомонад.

Для получения культуры актиномицетов 50 г нейтральной, слабощелочной почвы или торфа помещают в стерильную колбу объемом 250 мл, добавляют 50–60 мл физиологического раствора (0,85% раствор NaCl в дистиллированной воде). Содержимое колбы хорошо перемешивают, после чего 0,1 мл жидкости вносят в предварительно подготовленную чашку Петри со средой для выделения актиномицетов и распределяют по поверхности среды шпателем. Инкубируют при 28 °С в течение трех суток.

Состав среды для выделения актиномицетов (по Егорову, 2004)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1 г

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 г

$\text{MgSO}_4$  – 1 г

$\text{NaCl}$  – 1 г

Крахмал – 10 г

Агар – 15 г

Вода водопроводная – до 1 л

Для исследования антибиотической активности выделенных актиномицетов используют **метод агаровых блоков**. Для этого необходимо приготовить чашку Петри с агаризованной питательной средой. Стерильной стеклянной пробиркой вырезают лунку в центре чашки, куда помещают вырезанный аналогичным образом агаровый блок из чашки с выросшими актиномицетами. Чашку помещают в термостат при 28 °С на 18–20 ч, чтобы накопившийся в агаровом блоке антибиотик лучше продиффундировал в окружающий агар. Затем по радиусам агаровой пластинки высевают штрихами тест-организмы, например *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseus*. Чашку снова помещают в термостат при 28 °С на 24 ч.

Показателем продукции антибиотических веществ микроорганизмами, находящимися в центре чашки, служит отсутствие роста тест-организмов на том или ином расстоянии от блока.

Другая вариант метода агаровых блоков состоит в следующем. Изучаемый на антагонистическую активность микроорганизм-продуцент антибиотиков засевают на поверхность питательной среды сплошным газоном и ставят в термостат на сутки. Перед проведением опыта на новую чашку Петри с питательной средой засевают сплошным газоном тест-объект. С помощью стерильной пробирки вырезаем агаровые блоки микроорганизма-продуцента и накладываем их стерильной пробиркой или шпателем ростом вверх на равном расстоянии друг от друга на питательную среду с тест-объектом. Помещают чашку в термостат и инкубируют. Вокруг блоков микроорганизмов, синтезирующих антибиотики, подавляется рост тест-объекта, в результате образуются зоны задержки роста. Чем больше и чем активнее действие антибиотического вещества на тест-культуру, тем больше зона задержки роста вокруг агарового блока.

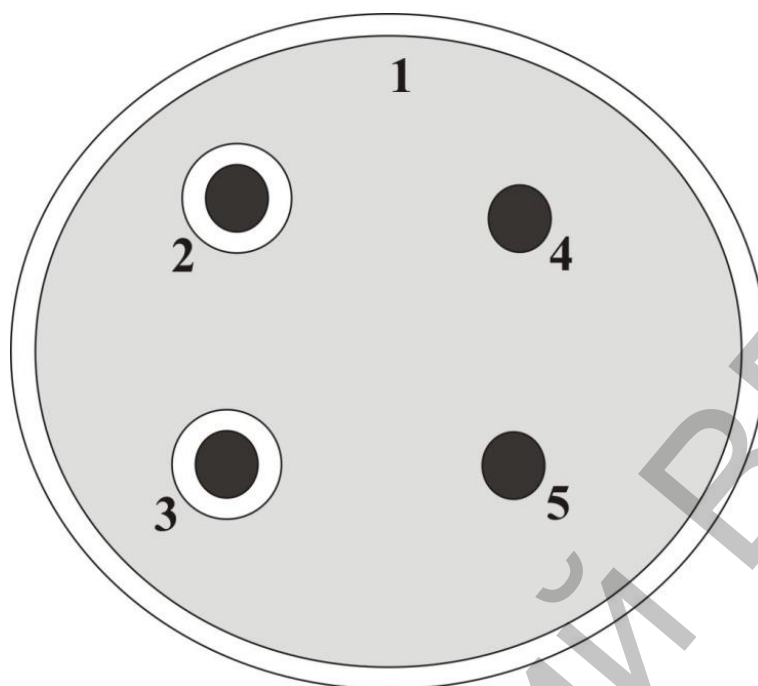


Рис. 11. Определение антибиотической активности  
методом агаровых блоков:

1 – газон тест-культуры; 2, 3 – зоны задержки роста вокруг блоков с продуцентами антибиотиков; 4, 5 – блоки с культурами, не синтезирующие антибиотики.

**Метод перпендикулярных штрихов.** На питательную среду по диаметру чашки Петри высевают культуру микроорганизма-продуцента антибиотика. Чашку помещают в термостат и культивируют несколько суток. После завершения роста микроба-антагониста и накопления антибиотического вещества в питательной среде на нее всевают тест-организмы перпендикулярно выросшему штриху, начиная от краев. Чем дальше от штриха наблюдается рост тест-организмов, тем они чувствительнее к действию антибиотического вещества. Нечувствительные культуры формируют штрихи, в плотную подходящие к продуценту антибиотика.

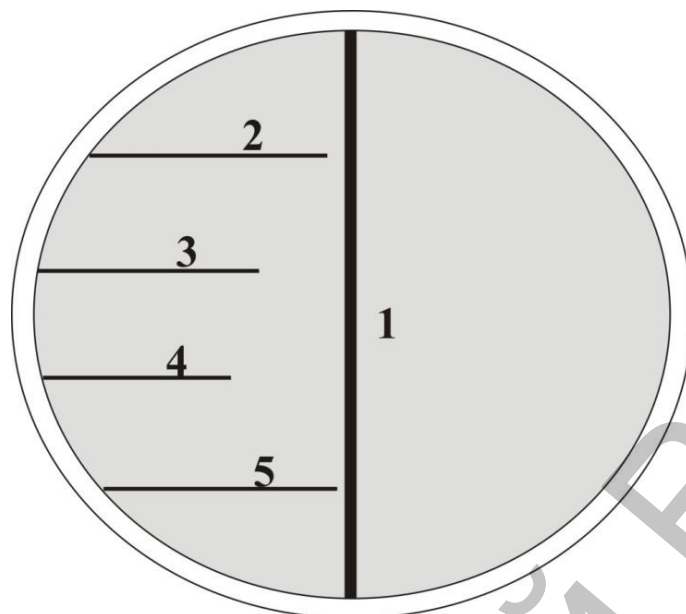


Рис. 12. Определение антибиотической активности микроорганизмов методом перпендикулярных штрихов:

1 – штрих продуцента антибиотического вещества; 2, 5 – рост нечувствительных тест организмов; 3, 4 – рост чувствительных микроорганизмов

### Лабораторная работа № 12. Учет численности микроорганизмов

Численность микроорганизмов и их биомасса являются важнейшими санитарными показателями различных сообществ сред жизни. Количество клеток микроорганизмов в определенном объеме называется титр. Методы определения численности подразделяются на прямые и косвенные. Прямые являются более точными и подразумевают непосредственный подсчет клеток. Косвенные методы направлены на учет показателей, зависящих от количества или биомассы микроорганизмов: число колоний, выросшее на питательной среде, оптической плотности суспензии исследуемой культуры, содержании какого-либо химического вещества (белка, ДНК).

**Подсчет клеток в счетных камерах.** Используется для определения численности крупных микроорганизмов (дрожжей, водорослей, простейших). Учет численности проводится в камере Горяева – Тома. Это толстое предметное стекло, в центральной части которого нанесена сетка. Площадь больших и малых квадратов сетки  $1/25 \text{ мм}^2$  и  $1/400 \text{ мм}^2$  соответственно. Глубина камеры 0,1 мм.

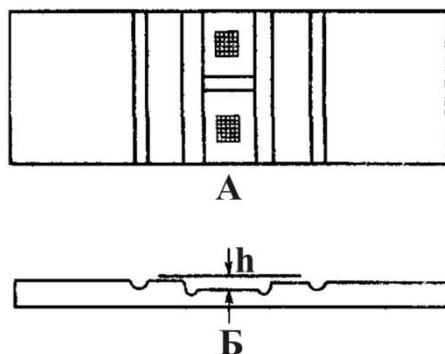


Рис. 13. Счетная камера Горьева – Тома:  
А – вид сверху; Б – вид сбоку

Перед началом работы углубление камеры накрывают специальным шлифованным покровным стеклом и прижимают его, двигая в противоположные стороны. После этого вводят исследуемую суспензию. Камеру Горьева – Тома помещают на предметный столик микроскопа и считают клетки микроорганизмов при увеличении объектива  $\times 10$  или  $\times 40$ . Подсчет клеток проводят в 10 больших или 20 малых квадратах, двигаясь по диагонали. При этом количество клеток в больших квадратах не должно превышать 20, а в малых – 10. Если наблюдается превышение, жидкость с тест-объектами дополнительно разводят. Число клеток микроорганизмов в 1 мл исследуемой суспензии определяют по формуле:

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

где  $M$  – число клеток в 1 мл суспензии;  $a$  – среднее количество клеток в квадрате сетки;  $10^3$  – коэффициент перевода в  $\text{см}^3$ ,  $n$  – коэффициент разведения исследуемой суспензии;  $h$  – глубина камеры;  $S$  – площадь квадрата сетки.

**Подсчет клеток в окрашенных препаратах (метод Виноградского – Брида).** Метод используется для подсчета микроорганизмов в естественных субстратах. На обезжиренном предметном стекле, которое располагают на миллиметровой бумаге, с помощью маркера наносят рамку определенного размера (2, 4, 6  $\text{см}^2$ ). Затем в эту рамку наносят известный объем суспензии с микроорганизмами. Жидкость распределяют в пределах отмеченной рамки бактериологической петлей, высушивают препарат на воздухе, после чего фиксируют 10–20 минут 96%-ным этанолом. Далее препарат окрашивают 1–2 минуты (фуксином, метиленовым синим или другим красителем). После этого краситель сливают, препарат промывают, последовательно погружая стекло в 5–6 сосудов с водой и высушивают на воздухе. Клетки микроорганизмов подсчитывают при помощи иммерсионного объектива  $\times 90$  в квадратах окулярной сетки или полях

зрения. Площадь квадрата сетки или поля зрения определяют с помощью объект-микрометра. Подсчеты производят в 50–100 полях зрения, при этом общее количество обнаруженных клеток должно быть не менее 600. Число клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times S}{V \times s} \times n,$$

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

**Подсчет клеток на мембранных фильтрах.** Данный метод используется для определения численности клеток в субстратах, с низким содержанием микроорганизмов, а также санитарно-микробиологических исследованиях. Для подсчетов используются фильтры, размер пор которых позволяет задерживать все микроорганизмы, содержащиеся в изучаемом субстрате. Стерильный фильтр помещают на фильтродержатель подготовленного вакуумного насоса. Через фильтр пропускают известный объем исследуемого материала. После чего фильтр снимают и проводят дальнейшие действия. Для определения количества осевших клеток осуществляют окрашивание 5%-ным карболовым эритрозином. Для этого фильтр нижней стороной помещают в чашку Петри, в которой находится фильтровальная бумага, увлажненная красителем. Чашку закрывают и оставляют на 1 час. Затем фильтр отмывают от красителя, последовательно перенося его в чашки Петри с фильтровальной бумагой, увлажненной водой, до того момента, пока бумага не перестанет окрашиваться. Далее фильтр высушивают на воздухе и готовят препарат: на предметное стекло наносят иммерсионное масло и кладут фильтр, на его поверхность добавляют каплю иммерсионного масла и накрывают покровным стеклом. Клетки микроорганизмов подсчитывают припомощи иммерсионного объектива  $\times 90$  в квадратах окулярной сетки или полях зрения как в методе Виноградского – Брида. Число клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \times F \times 10^6}{V \times s},$$

где  $M$  – число клеток в 1 мл исходной суспензии;  $a$  – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);  $F$  – площадь мембранного фильтра, мм<sup>2</sup>;  $V$  – объем профильтрованной жидкости, мл;  $s$  – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм<sup>2</sup>;  $10^6$  – коэффициент перевода мм<sup>2</sup> в мкм<sup>2</sup>.

Для определения количества жизнеспособных клеток, фильтр с микроорганизмами помещают на питательную среду, и по количеству выросших колоний судят о числе жизнеспособных клеток. Также подсчет и оценку количества, численность определенных групп и число жизнеспособных клеток можно осуществлять при помощи люминесцентной микроскопии. Для этого используются различные флуорохромы. Например, при окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные и нежизнеспособные клетки будут иметь различный цвет.

**Определение количества жизнеспособных клеток путем высева на плотные питательные среды (чашечный метод Коха).** Метод применяется для определения численности микроорганизмов в естественных субстратах и лабораторных культурах. Основан на постулате Коха, согласно которому, каждая колония является потомством одной клетки. Данный метод включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду, подсчет колоний (рис. 11).

Для приготовления разведений используют физиологический раствор. Готовят серию разведений, где каждая следующая пробирка будет содержать количество микроорганизмов в 10 раз меньше предыдущей. В стерильные пробирки наливают по 9 мл стерильного физраствора. После чего в первую пробирку добавляют стерильной 1 мл исследуемой суспензии. Ее тщательно перемешивают, после чего берут новой стерильной пипеткой 1 мл жидкости из первой пробирки и вносят во вторую пробирку. Далее эти действия повторяют по отношению ко второй, третьей и всем остальным пробиркам. Степень разведения зависит от плотности популяции исследуемых микроорганизмов: чем она выше, тем больше разведений готовят.

Посев в основном проводят из трех последних пробирок. Для этого на подсушенную питательную среду из пробирки стерильной пипеткой наносят 0,1 мл суспензии и распределяют ее стерильным шпателем. Из каждого разведения посев делается одновременно на две чашки, при этом используются стерильные инструменты. Чашки закрывают крышками и помещают в термостат на сутки.

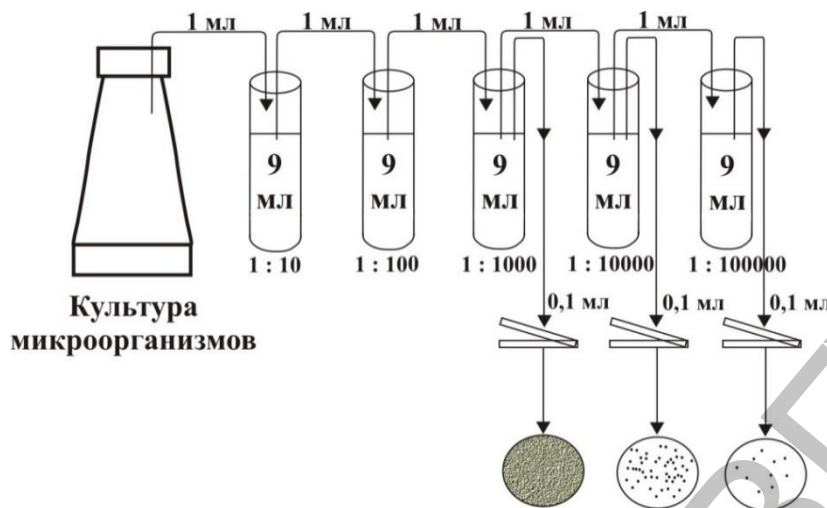


Рис. 14. Схема постановки эксперимента по определению количества жизнеспособных бактерий чашечным методом Коха

Спустя отведенное время подсчитывают выросшие колонии. Учитывают результаты каждого разведения на обеих чашках, определяя среднее число колоний. Для определения общего количества клеток следует учитывать те разведения, при посеве которых на чашках выросло от 30 до 300 колоний. Количество клеток в 1 мл субстрата определяют по формуле:

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

где  $M$  – число клеток в 1 мл исходной суспензии;  $a$  – среднее количество колоний на чашке Петри при посеве разведения;  $10^n$  – коэффициент разведения, соответствующий номеру пробирки, из которой сделан высев;  $V$  – объем суспензии, отобранной для посева мл.

**Определение количества микробных клеток нефелометрическим методом.** Данный метод широко используется в лабораторных исследованиях, так как позволяет быстро и эффективно определить концентрацию клеток в исследуемой суспензии. В основе метода лежит измерение ослабления пучка света при его прохождении через суспензию клеток: чем больше клеток, тем сильнее рассеивание пучка света. Изменение интенсивности света фиксируют при помощи нефелометра, спектрофотометра или фотоэлектроколориметра при длине волны 540–650 нм. Чаще всего строят калибровочные кривые, отражающие зависимость между концентрацией клеток и степенью рассеивания света. Для этого определяют оптическую плотность суспензий с различным содержанием клеток и в каждой из них определяют одним из доступных методов количество клеток в единице объема. Найденную зависимость отражают графически.

## Раздел III

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

Брожение – способ получения энергии путем субстратного фосфорилирования в результате бескислородного окисления органических веществ. Этот процесс относят к самым древним и примитивным способам получения АТФ, так как из окисляемого вещества извлекается лишь небольшая доля энергии, которая в нем содержится. В качестве субстратов для брожения могут использоваться различные органические соединения, но чаще всего моносахариды – гексозы. Энергетический выход в расчете на 1 моль глюкозы варьирует от 1 моль АТФ (при гетероферментативном молочнокислом) до 3,3 моль АТФ (при маслянокислом). В зависимости от того, какой основной продукт будет накапливаться в среде, выделяют следующие типы брожения: молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое, уксуснокислое, брожение смешанного типа.

### Лабораторная работа № 13. Изучение маслянокислого брожения

Происходит в бескислородных условиях и осуществляется облигатно анаэробными бактериями рода *Clostridium*, обитающими в почве, загрязненных водоемах, на поверхности растений, в молоке, в рубце жвачных животных. Также среди представителей данного рода есть и патогенные виды: *C. tetani* – возбудитель столбняка, *C. botulinum* – возбудитель ботулизма, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. novyi* – возбудители газовой гангрены. Особенности клостридий являются: облигатно анаэробный характер катаболизма, способность образовывать эндоспоры, неспособность осуществлять диссимиляционную сульфатредукцию, палочковидная морфология, грамположительность, жгутики расположены по всей клетке.

В зависимости от сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридий: сахаролитические, протеинолитические, пуринолитические, целлюлолитические.

По основному продукту маслянокислое брожение подразделяют на истинное маслянокислое (сбраживается крахмал, глюкоза), ацетонобутиловое и брожение пектиновых веществ. Схема маслянокислого брожения может быть представлена следующим уравнением реакции:



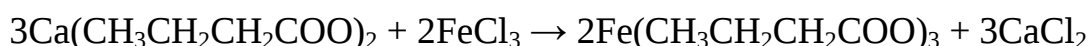
Получить культуру маслянокислых бактерий можно несколькими способами. Для изучения маслянокислого брожения крахмала в качестве субстрата используют сырой неочищенный картофель. Его нарезают узкими дольками и заполняют ими треть пробирки, добавляют немного мела, и заливают на две трети водой. Пробирку закрывают пробкой и ставят на водяную баню при 80 °С на десять минут для пастеризации. Помещают пробирку на несколько дней в термостат.

Для изучения маслянокислого брожения пектиновых веществ в качестве субстрата используют сухие стебли травянистых растений. Сначала готовят снопики – связывают несколько стеблей крапивы или льна в двух местах. Длина снопика 4–7 см, к нему привязывают длинную нитку. Затем снопики помещают в термостойкий стакан или колбу, заливают водой и кипятят 1–2 минуты. Воду сливают, заливают новую и повторяют процедуру еще 4–5 раз. После этого в состав снопика добавляют свежую соломинку, снопики раскладывают в пробирки, заливают остывшей водой из последнего кипячения, закрывают пробкой и ставят в термостат при 30–35 °С на 2–3 дня. О протекании масляного брожения в обоих опытах свидетельствует выделение газа, изменение характера субстрата и появление характерного запаха масляной кислоты.

Для микроскопического изучения маслянокислых бактерий берут либо жидкость из среднего слоя пробирки с картофелем, либо выжимают жидкость из соломинок в снопике. Жидкость наносят на предметное стекло, добавляют каплю реактива Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под иммерсией. В жидкости из первого опыта можно обнаружить *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum*, в жидкости из второго опыта – *C. pectinovorum*, иногда *C. felsineum*. Во всех клетках можно обнаружить споры – овальные тельца, сильно преломляющие свет, а также наличие грулезы, которая окрашивается реактивом Люголя в сине-фиолетовый цвет.

### Качественные реакции на маслянную кислоту

Первая качественная реакция – получение маслянокислого железа, которое образуется при нагревании нейтрального раствора масляной кислоты с FeCl<sub>3</sub>, в результате наблюдается коричневое окрашивание. В пробирку наливают 3–5 мл культуральной жидкости, добавляют 1–2 мл 5%-го хлорида железа (III) и начинают нагревание. Уравнение реакции выглядит следующим образом:

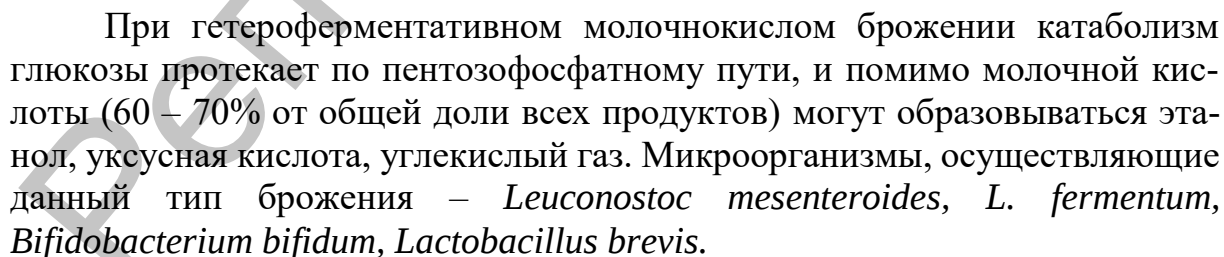


Вторая реакция – получение масляноэтилового эфира серной кислоты, имеющей запах ананаса. Для этого 3–5 мл сброженной жидкости добавляют 0,5 мл 96% этанола и 1–2 мл концентрированной серной кислоты. При

$$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2 + 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 + \text{Ca}(\text{OH})_2$$

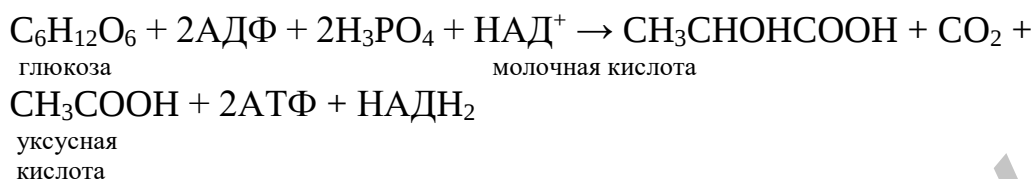
Молочнокислые бактерии относятся к семействам *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*, обитают на поверхности растений и пищевых продуктов, в молоке, кишечнике животных и человека. Отличительными особенностями данной группы микроорганизмов являются: способность образовывать лактат, грамположительность, неподвижность, неспособность образовывать споры, устойчивость к кислой среде (критические значения  $pH = 3,5-4$ ), шаровидная или палочковидная форма клеток, требовательность к источникам азота, отсутствие цитохромов и каталаз, синтез АТФ только за счет брожения. Молочнокислые бактерии участвуют в получении кисломолочных продуктов и сыра из молока, квашении овощей, приготовлении силоса. Выделяют два типа молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное.

Общий вид уравнения реакции:


$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHONCOOH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{АТФ}$$

глюкоза
молочная кислота
этанол

Общий вид уравнения реакции:



При изучении молочнокислых бактерий лучшей питательной средой для них является молоко. Следует отметить, что в молоке также могут развиваться и другие группы микроорганизмов (гнилостные, маслянокислые), но молочная кислота будет быстро их подавлять.

**Получение культуры молочнокислых бактерий из молока и молочных продуктов.** Опыт по получению культуры молочнокислых бактерий ставят следующим образом. Берут колбы Эрленмейра на 100 мл, наливают в них по 50 мл молока и закрывают ватными пробками. Одну колбу ставят в термостат при температуре 30 °С на 10–12 часов – в ней произойдет скисание молока и образование сгустка из-за деятельности молочнокислых бактерий. Вторую колбу ставят на плитку и доводят до кипения – при этом гибнут молочнокислые микроорганизмы, но могут сохраняться споры маслянокислых бактерий. При прорастании этих спор в результате деятельности маслянокислых бактерий молоко приобретает кремовый цвет, прогорклый вкус и запах масляной кислоты.

Для микроскопического изучения молочнокислых бактерий препарат готовят из прокисшего молока. Для этого стерильную бактериологическую петлю вводят в молочный сгусток, размазывают его по поверхности предметного стекла очень тонким слоем и высушивают на воздухе. Препарат фиксируют смесью этанола и эфира, несколько раз нанося на мазок и сливая ее. В качестве красителя используют метиленовый синий, наносят его на 2–3 минуты, промывают препарат водой, высушивают на воздухе и микроскопируют под имерсией. Под микроскопом можно обнаружить короткие цепочки из округлых клеток – *Lactococcus lactis*, или тонкие палочки бактерий *Lactobacillus*.

**Получение культуры молочнокислых бактерий из почвы.** Другим источником получения культуры молочнокислых бактерий может служить почва, где они концентрируются в ризосфере дикорастущих и культурных растений. Их также можно обнаружить на поверхности стеблей, листьев, цветов, фруктов и овощей. Для выделения молочнокислых бактерий следует использовать среды, обеспечивающие потребность в питательных веществах и угнетающие рост прочих микроорганизмов. Для молочнокислых бактерий характерна высокая спиртоустойчивость: некоторые виды могут расти на средах с 15–18 % этилового спирта, а в редких случаях и до 24%.

Навеску исследуемого субстрата массой 2 г помещают в пробирку с 10 мл жидкой питательной среды, которая содержит 10% растительного

(морковного, капустного) отвара, 2% глюкозы, 1% пептона, 1% дрожжевого экстракта, тщательно ресуспендируют и инкубируют при 28 °С. Для ингибирования роста дрожжей можно добавить 10 мг циклогексимида на 1 л питательной среды. Через сутки в пробирку с выросшей культурой вносят 10 % этилового спирта, после чего инкубируют еще 2 суток.

Полученную культуру высевают в чашки Петри, для чего 0,1 мл культуры в жидкой среде смешивают с 20 мл расплавленной и охлажденной до 50 °С среды агаризованной питательной среды того же состава с добавлением 4% измельченного мела. Инкубируют в течение трех суток при 28 °С. Проводят описание морфологических признаков бактериальных колоний. Отличительным признаком молочнокислых бактерий при культивировании на данной среде служат зоны просветления вокруг колоний, которые образуются при растворении карбоната кальция выделяемой бактериями молочной кислотой. При этом образуется растворимый лактат кальция.

**Качественная реакция на молочную кислоту – реакция «серебряное зеркало».** В термостойкую коническую колбу на 100 мл приливают 5 мл фильтрата молочной кислоты, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, ставят колбу на асбестовую плитку и нагревают до начала кипения. После этого, продолжая нагревание и помешивание, пипеткой по каплям добавляю 5 мл 5%-го раствора  $\text{KMnO}_4$ , который обесцвечивается. Молочная кислота переходит в уксусный альдегид:



Для обнаружения уксусного альдегида горлышко пробки накрывают фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором  $\text{AgNO}_3$ , продолжая нагревание. Бумага почернеет и приобретет серебристый отблеск в результате выделения металлического серебра.

**Количественное определение содержания молочной кислоты в кисломолочных продуктах.**

Важнейшим показателем эффективности молочнокислого брожения, а, следовательно, и качества получаемого кисломолочного продукта, служит образование молочной кислоты. Содержание молочной кислоты в исследуемом продукте можно определить путем титрования раствором  $\text{NaOH}$ . Кислотность молока или кисломолочного продукта выражается в градусах Тернера (°Т) или процентах молочной кислоты. Так, 1°Т соответствует 1 мл 0,1 н. раствора  $\text{NaOH}$ , израсходованного на титрование 100 мл исследуемого продукта. Молекулярная масса молочной кислоты равна 90. Тогда для приготовления 1 л 1 н. раствора необходимо 90 г кислоты, следовательно, в 1 мл 0,1 н. раствора содержится 0,009 г кислоты, что соответствует 1 Т. Для каждого молочного продукта, производимого промышленностью,

Министерством здравоохранения установлены нормы кислотности, которые свидетельствуют о качестве продукта.

Для определения количества молочной кислоты исследуемый образец (молоко, кефир, сметана, сливки, культура молочнокислых бактерий и т.д.) смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1 : 3, центрифугируют 5 мин при 12000 об/мин, супернатант сливают в чистую пробирку. Затем 10 мл исследуемой жидкой фракции (супернатанта) помещают в колбу Эрленмейера. К пробе добавляют 1–2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Определяют объем затраченного на титрование 0,1 н. раствора NaOH, определяют количество молочной кислоты в °Т.

Допустимые нормы кислотности в °Т продуктов молочной промышленности приведены в таблице 3.

На основании полученных данных делают вывод о качестве исследуемого продукта.

Таблица 3 – **Нормы кислотности молочных продуктов**

| <b>Продукт</b> | <b>Кислотность (в °Т)</b> |
|----------------|---------------------------|
| Молоко         | 16–18                     |
| Ацидофилин     | 75–130                    |
| Ряженка        | 85–150                    |
| Варенец        | 75–120                    |
| Йогурт         | 85–150                    |
| Мацони         | 75–120                    |
| Кефир          | 70–120                    |
| Творог         | 240                       |
| Сметана        | 60–100                    |
| Сливки         | 17–18                     |
| Кумыс          | 60–120                    |

#### **Определение степени бактериальной обсемененности молока и кисломолочных продуктов.**

Молоко может содержать значительное количество различных микроорганизмов. При соблюдении санитарных правил в молоке преобладают молочнокислые бактерии, сарцины, микрококки, стрептококки. Загрязненное молоко содержит большое количество бактерий группы кишечной палочки, а также маслянокислых и гнилостных бактерий. Микроорганизмы попадают в молоко преимущественно при дойке с кожи животного, поверхности вымени, рук и одежды доильщика, с посуды, оборудования, кормов. Молоко представляет собой благоприятную среду для развития микроорганизмов, поэтому при соответствующих температурных условиях происходит их быстрое размножение. При хранении молока количество и соотношение

между отдельными видами бактерий изменяется. Конкретная картина изменений определяется начальным составом микрофлоры в молоке, продолжительностью и температурой хранения. При микробиологическом анализе молока определяют общую численность бактерий, титр кишечной палочки, проводят пробу на редуктазу.

Наряду с прочими ферментами в молоке содержится редуктаза – анаэробная дегидрогеназа, которая передает водород от окисляемого субстрата любому ненасыщенному соединению, но не может передавать его кислороду воздуха. Редуктаза накапливается в молоке главным образом при размножении в нем микроорганизмов, поэтому ее количество в молоке служит показателем его бактериальной обсемененности. Обнаружить редуктазу можно по обесцвечиванию метиленового синего или резазурина.

Для оценки количества редуктазы в молоке в стерильные пробирки наливают 10 мл анализируемого молока, 1 мл 0,0005% водного раствора резазурина. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают в термостат на 38–40 °С. Изменение окраски фиксируют через 20 мин и через 1 ч.

Сравнивают полученные результаты с данными, приведенными в таблице 4. Делают заключение о качестве исследуемого образца.

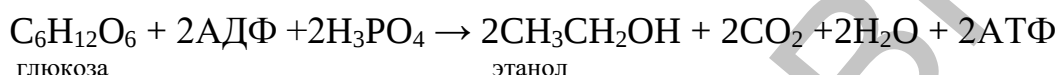
**Таблица 4 – Показатели бактериальной обсемененности молока и его качества на основании редуктазной пробы с применением резазурина**

| Качество молока    | Количество бактерий (млн / мл) | Продолжительность изменения цвета, мин | Окраска молока                |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|
| Хорошее            | Менее 0,5                      | 60                                     | Сине-стальная                 |
| Удовлетворительное | 0,6–4,0                        | 60                                     | Сине-фиолетовая или сиреневая |
| Плохое             | 4,0–20,0                       | 60                                     | Розовая или белая             |
| Очень плохое       | Более 20,0                     | 20                                     | Белая                         |

## Лабораторная работа № 15. Изучение спиртового брожения

Протекает в бескислородных условиях по гликолитическому пути. Осуществляется рядом организмов, относящихся к прокариотам и эукариотам. Среди прокариот данный тип брожения осуществляют *Erwinia amylovora*, *Sarcina ventriculi*, *Zymomonas mobilis*. Среди эукариот наиболее изученными продуцентами этанола, имеющими практическое применение, являются представители рода *Saccharomyces*. Данный тип брожения используется в пивоваренной, винодельческой, хлебопекарной отрасли.

Общий вид уравнения реакции:

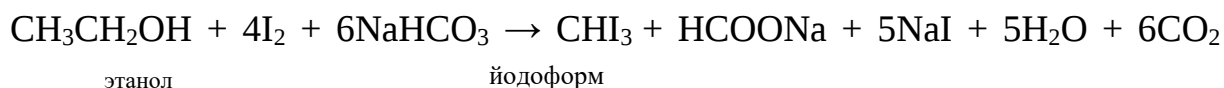


Для микроскопического изучения *Saccharomyces* с помощью стерильной бактериологической петли или пипетки извлекают несколько капель из бродящей жидкости и наносят на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют под иммерсией. К исследуемой суспензии можно добавить каплю реактива Люголя для обнаружения включений гликогена.

Количественную оценку спиртового брожения осуществляют путем определения массы выделившегося углекислого газа. Для постановки опыта в плоскодонную колбу наливают определенный объем сахаросодержащей среды и вносят 0,5 г прессованных дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейселя с клапаном Бунзена, взвешивают и помещают в термостат при температуре 25 °С. Через нее будет выходить углекислый газ. Измерив вес колбы в начале опыта и через несколько дней можно обнаружить изменение веса за счет выделения газа в результате брожения.

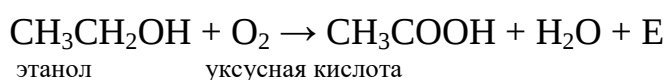
### Качественная реакция на этанол

Для проведения реакции используются спиртосодержащие продукты, образующиеся при конденсации и охлаждении нагреваемой бродящей жидкости. В пробирку приливают 3–5 мл конденсата, добавляют 3–5 мл 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и примерно 0,1 г кристаллического йода. Полученную суспензию взбалтывают и нагревают на водяной бане при температуре 60 – 70 °С до полного растворения йода. При охлаждении раствора из него выпадают светло-желтые кристаллы йодоформа, имеющие специфический запах. Общий вид уравнения реакции образования йодоформа можно записать следующим образом:



## Лабораторная работа № 16. Изучение уксуснокислого брожения

Ацетат может образовываться в качестве побочного продукта различных типов брожения (спиртовом, смешанном, маслянокислом). Характерной особенностью уксуснокислого брожения является обязательное наличие кислорода, этот процесс осуществляют микроорганизмы семейства *Acetobacteriaceae*. Представители данной группы имеют следующие признаки: палочковидные, грамотрицательные, ауксотрофные, неподвижные или слабоподвижные аэробы не образующие спор, окисляющие этанол до уксусной кислоты для получения энергии. Уксуснокислое брожение используется в пищевой промышленности. Общий вид уравнения реакции:

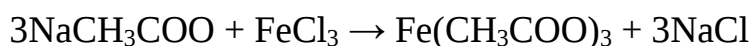


Для получения накопительной культуры уксуснокислых бактерий в качестве питательного субстрата используют пиво. Его наливают в колбы высотой до 1 см, закрывают колбы ватными пробками и ставят в термостат на 5–6 дней при температуре 30 °С. На поверхности субстрата образовывается пленка, имеющая различный характер (тонкий беловато-серый или кожистый плотный), в которой обнаруживаются представители семейства *Acetobacteriaceae*.

Для микроскопического изучения уксуснокислых бактерий стерильной бактериологической петлей отбирают фрагмент пленки с поверхности субстрата, готовят мазок, фиксируют его над спиртовкой, окрашивают йодом и рассматривают под иммерсией. В приготовленном препарате можно обнаружить следующие виды рода *Acetobacter*: *A. aceti* – короткие палочки, способные образовывать длинные цепочки, цитоплазма окрашивается в желтый цвет, на поверхности пива образуют гладкую слизистую пленку; *A. pasteurianum* – на поверхности субстрата образуют сухую морщинистую пленку, цитоплазма окрашивается в синий цвет; *A. xylinum* – образует толстую пленку, цитоплазма окрашивается в синий цвет.

### Качественная реакция на уксусную кислоту

В пробирку наливают 5 мл скисшего пива, добавляют несколько капель NaOH, перемешивают и приливают 0,5–1 мл 10% FeCl<sub>3</sub>. После нагревания наблюдается появление темно-красного окрашивания в результате образования ацетата железа. Уравнение реакции выглядит следующим образом:



## Лабораторная работа № 17. Микробиологические основы хлебопечения

Процесс хлебопечения известен с глубокой древности. В настоящее время хлеб остается важным компонентом питания для жителей многих стран. Его приготовление, начиная от смешивания муки с водой и заканчивая выпечкой, включает в себя ряд биохимических и микробиологических процессов.

Мука, используемая для изготовления ржаного и пшеничного хлеба, содержит вещества, необходимые для развития многих микроорганизмов. Помимо основного компонента – крахмала, в ней присутствует до 2% сбраживаемых сахаров – глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы. Среди азотсодержащих веществ в муке велика доля белков, среди которых преобладают альбумины, глобулины и белки клейковины. Основным показателем хлебопекарных свойств для пшеничной муки является содержание белка (клейковины). Мука высшего сорта должна содержать не менее 28% сырой клейковины. В муке содержится до 2% жиров и жироподобных веществ и до 2% минеральных веществ, в том числе ряд микроэлементов.

В муке всегда присутствует значительное количество разнообразных микроорганизмов. Их жизнедеятельность, наряду с содержащимися в муке ферментами, имеет важнейшее значение для приготовления хлеба. Численность микроорганизмов зависит от степени загрязненности зерна и способов его очистки. Кроме того, в процессе приготовления теста, некоторые микроорганизмы вносятся целенаправленно. Ведущую роль играют дрожжи и молочнокислые бактерии. При этом качество хлеба определяется в первую очередь дрожжами. Выделяемый ими в ходе брожения углекислый газ поднимает тесто (процесс заквашивания).

Пористость, окраска, сохранение свежести хлеба, его вкус и аромат определяются прежде всего микробиологическими процессами и связанными с ними биохимическими изменениями в ходе приготовления теста.

Основными разрыхлителями теста служат дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* различных рас. Наиболее важны в хлебопечении такие свойства дрожжей, как высокая потенциальная активность гликолитических ферментов, стойкость их хранения, способность переносить высокие концентрации сахаров и NaCl в среде.

Чаще всего используются быстрораствующие расы сахарометов верхового брожения. На хлебозаводах используются как прессованные, так и сухие дрожжи. Подъемная сила дрожжей определяется как время подъема теста на стандартную высоту 70 мм в стандартной форме. У полноценных рас она не должна превышать 45 мин. Кроме того, дрожжи должны иметь 100 %-ю устойчивость к мелассе и скорость роста не менее  $0,2 \text{ ч}^{-1}$ .

Процесс приготовления жидких дрожжей из прессованных и сухих включает в зависимости от сорта хлеба заквашивание молочнокислыми

бактериями осахаренной и охлажденной до 50°C мучной заварки. Молочно-кислые бактерии, например, *Lactobacillus delbrueckii* ускоряют брожение в тесте. Благодаря их высокой протеолитической активности, в тесте накапливается значительное количество аминного азота, который положительно влияющего на скорость роста и подъемную силу дрожжей. Помимо *Saccharomyces* в тесте могут присутствовать дрожжи родов *Candida* и *Pichia* – *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. utilis*, *P. vini*, *P. xylosa*. В ржаных и пшеничных заквасках преобладают не дрожжи, а молочнокислые бактерии.

**Определение подъемной силы дрожжей.** В мерный стакан объемом 100 мл вносят 5 мл воды и 3,2 г прессованных дрожжей. Растирают дрожжи стеклянной палочкой до исчезновения комков, после чего добавлением теплой воды (температура 30°C) доводят объем суспензии до 100 мл и снова хорошо размешивают. Переносят в фарфоровую чашку 5 мл полученной суспензии. Добавляют 8 г пшеничной муки второго сорта и замешивают тесто, придав ему форму шарика. Процесс приготовления теста и шарика должен проходить быстро, занимая не более 4 минут. Шарик опускают в стакан объемом 200 мл, наполненный водой с температурой 30° С. Фиксируют время, прошедшее с момента погружения шарика на дно стакана до его всплытия на поверхность.

Оценивают качество дрожжей: очень хорошие имеют подъемную силу 10–15 мин, хорошие – 15–20 мин.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основной

Гусев, М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. М. : Издат. центр «Академия», 2003.

Лысак, В. В. Микробиология / В. В. Лысак. Минск : БГУ, 2008.

Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. М., 2006.

Царенко, Т. М. Микробиология. Практикум / Т. М. Царенко. – Витебск : Издательство УО «ВГУ имени П.М. Машерова», 2005. – 69 с.

### Дополнительный

Альберт, С. Б. Молекулярная биология клетки : в 3 т./ С. Б. Альберт [и др.]. М. : Мир, 1994. Т. 1–3.

Белясова, Н. А. Микробиология / Н. А. Белясова. Минск : БГТУ, 2005.

Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М. : Изд-во МГУ, 1995.

Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М. : Мир, 2002.

Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004.

Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елимов. М. : Высш. шк., 1989.

Желдакова, Р.А. Основы биотехнологии / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин, Е.И. Игнатенко, Ю.В. Селезнева – Минск : БГУ, 2009. – 48 с.

Квасников, Е. И. Биология молочнокислых бактерий / Е. И. Квасников. Ташкент, 2000.

Лысак, В. В. Микробиология. Практикум : пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – 115 с.

Лысак, В. В. Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. – Минск : БГУ, 2016. – 80 с.

Лысак, В. В. Физиология микроорганизмов : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – 210 с.

Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]. М. : Издат. центр Академия, 2005.

Нестеренко, О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования / О. А. Нестеренко. М., 1995.

Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. М. : Мир, 1997. Т. 1–2.

Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.

Русь, О. Б. Введение в биотехнологию: практикум / О.Б. Русь, А.М. Ходосовская. – Минск : БГУ, 2011. – 99 с.

Русь, О.Б. Введение в биотехнологию в понятиях и терминах. Справочник студента-биотехнолога. Пособие с грифом УМО / О.Б. Русь, А.М. Ходосовская, А.Н. Евтушенков. – Минск : БГУ, 2012. – 122 с.

Сиротин, А. А. Практикум по микробиологии / А. А. Сиротин. – Белгород : Изд-во БелГУ, 2007. – 80 с.

Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. Колос, 1993. – 175 с.: ил.

Стейниер, Р. Мир микробов : в 2 т. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М., 1979. 2 т.

Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. М. : Мир, 1987.

Bergeys Manual of Systematic Bacteriology / ed.-in-chief G. M. Garrity. N. Y. : Springer, 2001–2003. Vol.1–5.

Учебное издание

**ЛАТЫШЕВ** Сергей Эдуардович  
**ДЕРЖИНСКИЙ** Евгений Александрович

## **МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Методические рекомендации

Технический редактор *Г.В. Разбоева*  
Компьютерный дизайн *Л.Р. Жигунова*

Подписано в печать 2021. Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 3,14. Уч.-изд. л. 2,51. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014.

Отпечатано на ризографе учреждения образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.