

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ, МОЛОДЕЖИ И СПОРТА УКРАИНЫ  
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени В. Н. КАРАЗИНА

# **ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ**

Методические рекомендации для студентов  
биологического факультета  
специализации «Микробиология и вирусология»

Харьков – 2011

УДК 579 (076)  
ББК 28.4я 73-5  
В 48

**Рецензенты:**

**Гамуля Ю. Г.** – доцент кафедры ботаники ХНУ имени В. Н. Каразина, кандидат биологических наук;

**Прудникова Т. И.** – доцент кафедры микологии и фитоиммунологии ХНУ имени В. Н. Каразина, кандидат технических наук.

*Утверждено к печати решением Научно-методического совета  
Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина  
(протокол № 4 от 28.04.2011 года)*

**Выделение** и идентификация бактерий : методические рекомендации для  
В 48 студентов биологического факультета специализации «Микробиология  
и вирусология» / Сост. О. И. Винникова, А. М. Самойлов, Ю. В. Попова – Х. :  
ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. – 60 с.

Пособие содержит методические указания к спецпрактикуму «Выделение, получение чистых культур и идентификация микроорганизмов», который преподается студентам специализации «Микробиология и вирусология» биологического факультета Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Для студентов и преподавателей ВУЗов, колледжей, техникумов биологического, фармакологического, сельскохозяйственного профиля.

**УДК 579 (076)**  
**ББК 28.4я 73-5**

© Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2011  
© Винникова О. И., Самойлов А. М., Попова Ю. В., сост., 2011  
© Макет обложки, И. Н. Дончик, 2011

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ МИНИМУМ</b> .....	5
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1 .....	6
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2 .....	9
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3 .....	11
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4 .....	14
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5 .....	17
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 .....	20
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7 .....	23
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8 .....	28
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9 .....	35
<b>САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА</b> .....	45
<b>ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К КУРСУ</b> .....	47
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	49
<b>СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	58

## ВВЕДЕНИЕ

Методические указания по лабораторному спецпрактикуму предназначены для студентов 4 курса дневного отделения биологического факультета, которые проходят подготовку по специализации «Микробиология и вирусология».

Практикум состоит из 4 основных разделов – «Выделение, получение чистых культур и идентификация микроорганизмов», «Биохимические и генетические методы в микробиологии», «Базовые методы клинической и санитарной микробиологии», а также спецпрактикума «Методы почвенной и водной микробиологии». Данное пособие по лабораторному спецпрактикуму включает первый раздел практикума. Занятия начинаются с углубленного изучения материала, в который не входят вопросы, рассматриваемые в рамках малого практикума по микробиологии. При выполнении работ по данному курсу студенты должны основываться на знаниях, полученных в рамках спецпрактикума «Техника микробиологических исследований». А именно, иметь общие сведения о работе бактериологической лаборатории, оборудовании рабочего места, усвоить правила работы и техники безопасности в лаборатории, знать инструкции по санитарно-эпидемиологическому режиму в лаборатории, основополагающие нормативные документы в области микробиологии, иметь представление о порядке хранения, работе и отпуске культур микроорганизмов I-IV (V) групп. Студенты должны знать особенности уборки рабочего места, помещения, бокса, мытья лабораторной посуды; также должны знать перечень дезинфицирующих веществ, государственный реестр дезинфицирующих веществ, список действующих в Украине ГОСТ (ISO), методы стерилизации, применяемые в микробиологической практике. Кроме того, студенты должны уметь готовить мазки из микробных культур, выращенных на жидких и плотных средах, фиксировать мазки физическими и химическими способами, знать методы микроскопии, методы отбора проб почвы и воды и способы учета разных групп микроорганизмов на жидких и твердых питательных средах.

Спецпрактикум начинается с того, что студенты осваивают методы составления и приготовления сред, методы накопительных культур и получения чистых культур микроорганизмов (или используют культуры, выделенные в течение летней полевой практики по «Микробиологии»). Затем студенты осваивают общую схему идентификации неизвестного микроорганизма с использованием микроскопических методов и биотестов, знакомятся с практической систематикой бактерий и определителем Берджи.

# ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

## Теоретический минимум

1. Общие сведения о компонентах сред. Приготовление растворов с процентной, молярной и нормальной концентрацией. Расчет, приготовление и стерилизация матричных растворов. Факторы роста и термолabile органические компоненты (их использование и стерилизация). Уплотнители для сред. Требования к средам. Синтетические среды. Элективные среды. Дрожжевые среды и добавки. Селективные добавки. Дифференциально-диагностические среды. Установка рН сред и буферизация. Принципы составления минимальных синтетических и полусинтетических сред для определенной группы микроорганизмов. Подбор полноценных питательных сред для культивирования. Среда для поддержания и хранения микроорганизмов. Фильтрация, осветление, разлив и стерилизация сред.

2. Условия культивирования микроорганизмов. Культивирование аэробных, микроаэрофильных и анаэробных микроорганизмов. Кислотность среды, температура, свет, влажность и т.д.

3. Методы получения накопительных культур. Биофизические (низкие и высокие температуры, использование подвижности, использование фильтруемости, света и др.). Биохимические (кислые и щелочные условия, ингибирование различными химическими веществами – красителями, антибиотиками и др.). Биологические (основанные на паразитизме, симбиозе, антагонизме).

4. Получение чистых культур: посев истощающим штрихом на плотные среды, метод разведения в жидких и твердых средах. Получение чистых культур методами Коха и Дригальского. Получение чистых культур анаэробов. Использование микроманипулятора, капельный метод Линднера. Проверка культуры на чистоту (микроскопия, визуальный контроль, использование богатых и минимальных сред).

5. Культуральные свойства микроорганизмов. Основные способы постановки биотестов (понятия «индикаторная система», «индикатор», «тестируемая система» и «среда-основа»). Качественные реакции, пригодные для использования в микробиологии. Современные быстрые тесты: АРІ-тесты и наборы для быстрой идентификации. Экспресс-тесты. Схема идентификации неизвестной культуры. Принципы

практической систематики бактерий и использование определителя Берджи. Методы идентификации микроорганизмов без выделения в чистую культуру.

6. Хранение микроорганизмов. Периодические пассажи. Хранение под минеральным маслом. Лиофилизация. Ультразамораживание. Хранение в глицероле и высушенном состоянии. Оценка жизнеспособности культур после хранения. Методы активации и регенерации споровых и аспорогенных культур.

## **Лабораторная работа №1**

### ***Получение накопительной культуры гетероферментативных молочнокислых и маслянокислых бактерий***

Молочнокислые бактерии имеют самый широкий спектр питательных потребностей. Синтетические среды для их культивирования включают свыше 30 компонентов, среди которых аминокислоты, пурины и пиримидины, многие витамины и др. Кроме того, они содержат неопределенные добавки, например, в виде дрожжевого автолизата. Поэтому накопительные культуры молочнокислых бактерий лучше получать, используя естественные полноценные субстраты, путем создания элективных свойств. Хранить культуры молочнокислых бактерий рекомендуется в виде заквасок.

В данном методе сочетаются биофизический (температура) и биохимический способы создания элективных условий для накопительной культуры.

Оборудование и материалы: пробирки сахарные с ватно-марлевыми пробками стерильные, мерные и немерные колбы, колбы Эрленмейера на 250 мл с ватно-марлевыми пробками, химический стакан, чашки Петри, центрифужные стаканы, натрий лимоннокислый, сухие дрожжи, глюкоза, молоко, термостат.

### **Ход работы**

Заранее готовят дрожжевой автолизат в необходимом количестве. Для этого 200 г прессованных дрожжей разводят в 1 л воды, добавляют 2 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , каплями добавляют 1н NaOH (до pH 6,1) и 5 мл хлороформа, перемешивают и выдерживают при 37<sup>0</sup>С около 2 сут. Доводят раствором 1н NaOH pH до 7,4, кипятят 20 мин, фильтруют, стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин.

В стерильную пробирку отбирают 10 мл непастеризованного сепарированного свежего (коровьего) молока, добавляют 1% натрия лимоннокислого (100 мг), 2% дрожжевого автолизата (200 мкл), 1% глюкозы (100 мг).

Затем накопительную культуру ставят в термостат. Температуру инкубирования выбирают в зависимости от того, какие группы хотят выделить:

- +30<sup>0</sup>С – мезофилы;
- +45<sup>0</sup>С – термофилы;
- +25<sup>0</sup>С – для выделения *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Для серийных десятикратных разведений готовят пробирки с 9 мл забуференного изотонического раствора (0,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 6,5 г NaCl на 1 л дистиллированной воды), а также МПА с дрожжевым автолизатом и 10% молоком. Через 12-18 ч делают ряд разведений и получают изолированные колонии при глубинном засеве на полноценной среде. Инкубируют при +45<sup>0</sup>С. Полученные культуры термофильных лактобактерий засевают в стерильное (автоклавируют свежее обезжиренное) молоко в колбах, объемом 100 мл. Выдерживают 4-6 ч. По окончании оценивают органолептические свойства полученного кисломолочного продукта.

Из колоний, полученных на агаровых питательных пластинках, а также из кисломолочного продукта готовят микробиологические мазки. Их окрашивают разбавленным метиленовым синим 2-3 мин и микроскопируют. Устанавливают наличие молочнокислых бактерий соответствующей морфологии. Результаты микроскопии заносят в лабораторный журнал.

### ***Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий***

Маслянокислые бактерии (представители р. *Clostridium*) сбраживают углеводы и некоторые органические кислоты до масляной и уксусной кислот, H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. Клостридии – подвижные (перитрихи) анаэробные бактерии, которые обитают в почве и образуют споры по клостридиальному или плектридиальному типу.

### **Ход работы**

1. Нарезать небольшими ломтиками нечищенный сырой картофель.
2. Чистые пробирки заполнить ломтиками картофеля на 1/3.
3. Для нейтрализации среды (препятствует закислению среды) прибавить небольшое количество карбоната кальция (CaCO<sub>3</sub>) или мела.
4. Смесь залить водопроводной водой на 2/3 и закупорить пробкой.

5. Пробирки пастеризовать на водяной бане при 80<sup>0</sup>С в течение 20 мин.

6. После пастеризации пробирки инкубировать в термостате при температуре +32<sup>0</sup>С в течение 2-7 сут.

Клостридии можно изучать в раздавленных препаратах и методом висячей капли – при этом наблюдать за подвижными живыми бактериями.

При постановке опыта необходимо описать процессы, происходящие при брожении, и наблюдаемые визуально изменения:

- время появления газообразования;
- период наибольшего газообразования;
- сроки наступления частичного и полного гидролиза субстрата;
- сроки завершения брожения.

На 2-3 сутки культивирования из культуральной жидкости пастеровской пипеткой отбирают небольшое количество жидкости так, чтобы не перемешать жидкость в пробирке с поверхностным слоем. Из культуральной жидкости готовят мазки и окрашивают их несколькими способами:

- простая окраска раствором Люголя 2-3 мин
- простая окраска метиленовой синью 2-3 мин
- дифференциальная окраска по Граму.

Результаты микроскопии (тинкториальные свойства, наличие запасных веществ, наличие спор, а также морфологию клеток) заносят в лабораторный журнал.

На 5-7 сут. культивирования из поверхностного слоя отбирают 1-2 мл жидкости и проводят качественную реакцию на наличие масляной кислоты.

1. Для этого в 2 пробирки прибавляют по 0,5-1 мл отобранной жидкости.
2. В первую вносят 3-5 капель метанола, а во вторую – 4-5 капель изоамилового спирта.
3. Затем добавляют 2-3 капли концентрированной серной кислоты.

В результате реакций происходит образование сложных эфиров масляной кислоты и добавленных спиртов. При этом *метилбутират* будет иметь запах яблок, а *изоамилбутират* – запах груш. Результаты постановки проб заносят в лабораторный журнал.

## Лабораторная работа №2

### *Приготовление синтетической селективной среды Касераса (RC) и натуральной богатой среды бобового агара*

Целью настоящей работы является ознакомить студентов с приготовлением сложной синтетической среды RC и натуральной среды бобового агара. Работа включает расчет матричных растворов, отдельную стерилизацию, буферизацию среды и другое, что позволяет охватить многие аспекты приготовления сред.

#### *Состав среды Касераса (RC), г/л*

<i>Макрокомпоненты:</i>	<i>Микроэлементы, мг/л:</i>
L-яблочная кислота – 5;	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,00;
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ – 0,5;	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 2,35;
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;	$\text{H}_3\text{BO}_3$ – 2,80;
NaCl – 0,1;	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08;
$\text{CaCl}_2$ – 0,2;	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,24.
бромтимоловый синий	Витамины, мг/л:
(5%-й спиртовой раствор) – 2 мл;	Биотин – 0,1;
Fe-EDTA (1,64%-й раствор) – 4 мл.	Пиридоксин – 0,2.

#### *Рецепт маннитно-бобового агара*

Тщательно промытые бобы (15 г) засыпают в стакан, заливают 400 мл водопроводной (фильтрованной) воды и варят бобы до полного набухания (**но не растрескивания!**). Затем отвар фильтруют через ватно-марлевый фильтр или через стопку фильтров с помощью воронки Бюхнера. В фильтрат вносят в сухом виде соли: 0,5 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,25 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 г KCl и тщательно перемешивают до растворения солей. С помощью pH-метра выставляют pH среды, добавляя 0,1н КОН до pH 7,2. Объем среды доводят водой до 1 л. Разливают по колбам и агаризуют (1,5%). Плавят на водяной бане, кипятят до растворения агара и охлаждают до 55°C. Вносят в среду дополнительно 2,5 г маннита и 1,5 г глюкозы (в виде сухих веществ или растворов в объеме по 20 мл). При необходимости добавляют дрожжевой экстракт в объеме 1-2 мл на 1 л, который готовят следующим образом: 100 г сухих дрожжей разводят в 1 л воды, смесь прогревают при 60-80°C 30 мин, далее выдерживают на кипящей водяной бане 15 мин. Фильтруют или центрифугируют. Автоклавируют при 0,5 атм. 30 мин.

Оборудование и материалы: пробирки, мерные и немерные колбы на 100, 200 и 500 мл, химические стаканы на 100, 200 и 800-1000 мл, воронки стеклянные, пипетки градуированные на 1, 2 и 5 мл, пипетки на вылив на 10 и 20 мл, автосемплер со сменными насадками,

центрифужные пробирки, дрожжи сухие, реактивы согласно прописи, стандарт-титры, весы технические, весы торсионные, набор гирь и разновесов, водяная баня, или газовая горелка с подставкой и асбестовой сеткой, центрифуга, сушильный шкаф, рН-метр.

### Ход работы

1. Провести все необходимые расчеты для приготовления матричных растворов микроэлементов и витаминов, а также Fe-хелата и индикатора. Эти растворы должны содержать необходимую концентрацию вещества на 1 л среды в 1-5 мл раствора. При необходимости рассчитать матричные растворы макроэлементов. Обычно их рассчитывают так, чтобы в 10-50 (100) мл содержалась доза, необходимая для приготовления 1 л среды.
2. Начинают готовить среды с процедур, занимающих большой промежуток времени – получение бобового отвара и дрожжевого экстракта.
3. Делают все навески сухих веществ в химические стаканчики и растворяют их в небольшом количестве воды (10-50 мл). Макросоли сливают в стакан при перемешивании на магнитной мешалке. Затем добавляют 4 мл Fe-ЕДТА (1,64%-й раствор). Его необходимо вносить первым, т.к. содержащийся ЭДТА будет хелатировать металлы и микроэлементы, что позволит избежать образования нерастворимых осадков и трудно-доступных для бактерий солей, а также комплексов, которые могут значительно повлиять на свойства плотной среды. Затем добавляют растворы микроэлементов и пиридоксина в количестве 1-2 мл.
4. Раствор биотина (приготовленный на физиологическом растворе, рН 7,1-7,2) стерилизуют фильтрованием и добавляют с соблюдением правил асептики уже в стерильную среду. Раствор биотина стерилизуют фильтрованием либо готовят в стерильной посуде на стерильной воде и кипятят.
5. Готовят 100 мл раствора, содержащего 30 мг Конго красного. Его стерилизуют отдельно и вносят в среду в объеме 15-20 мл на 1 л.

6. Яблочная кислота устойчива к нагреванию, поэтому ее вносят в среду при приготовлении. Однако рН среды должно быть в пределах нейтральных значений. Для этого раствор яблочной кислоты (5 г в 50 мл) нейтрализуют раствором КОН (5,5 г в 50 мл) при добавлении 2 мл раствора бромтимол блау до бутылочно-зеленого цвета. Затем нейтрализованный раствор яблочной кислоты приливают в общую смесь. Объем среды доводят дистиллированной водой до 1 л.
7. С помощью рН-метра выставляют рН среды растворами 1 н КОН либо яблочной кислоты до рН 7,1 – 7,3.
8. Часть среды (жидкой) разливают в необходимое количество пробирок (для лаб. раб. №3), а остальную часть наливают в колбы до 2/3 объема и агаризуют из расчета 15-20 г агара на 1 литр среды.
9. Охлажденную до 60<sup>0</sup>С среду разливают с помощью автодозатора по 15 мл в необходимое количество сахарных пробирок (для лаб. раб. №3).
10. Оставшуюся часть среды в колбах закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками.
11. Маннитно-бобовый агар доготавливают согласно прописи. Среду разливают в необходимое количество пробирок по 6 мл (на косяки). Остаток среды оставляют в колбе.
12. Все среды стерилизуют.

**Лабораторная работа №3**  
***Получение чистых культур бактерий***  
***различными методами***

Наиболее распространенным способом получения чистых культур бактерий, является метод истощающего штриха с использованием плотных питательных сред. Однако у этого метода есть ограничения –

плохо рассеиваются плотные сухие колонии и врастающие в агар некоторые слизистые формы, а также бактерии, имеющие ограниченный рост на плотных средах.

Метод Коха (метод разведения в жидких и/или плотных средах) позволяет получить изолированные колонии (колонию из одной клетки, споры) только тех микроорганизмов, колонии которых хорошо диспергируются в жидких средах, либо форм, растущих только или преимущественно в жидких средах. Данный метод можно использовать также для некоторых слизистых форм, нередко не формирующих слизь в условиях культивирования в жидкой среде.

Получение чистых культур бактерий методом Дригальского используется только в отдельных случаях, в основном при работе с жидкими накопительными культурами и при использовании метода разведений.

Получение чистых культур анаэробов зачастую не отличается от выделения в чистую культуру аэробных форм, однако при этом используют анаэроостаты и выполняют работы в бескислородной среде (техника Хангейта). Проверку чистоты культуры проводят путем микроскопии, однако необходимо всегда учитывать способность многих бактерий к образованию различных по морфологии структур в течение жизненного цикла. Кроме того, для этих целей используют богатые и минимальные среды (МПА, бобовый агар и др.).

Оборудование и материалы: пробирки со средами или буферным раствором (см. лабораторную работу №2), термостат, стерильные чашки Петри, готовые среды.

## **Ход работы**

### ***Метод Коха***

- Три пробирки содержащие по 15 мл агаризованной среды Доберейнер ставят на водяную баню для расплавления.

- Расплавленную среду остужают до 45<sup>0</sup>С.

- В пробирку вносят одну бактериальную петлю исследуемого материала (накопительная культура для азоспирилл).

- Пробирку прокручивают между ладонями для тщательного перемешивания содержимого.

- Прокаленной и остуженной бактериальной петлей делают пассаж из 1 пробирки во вторую.

- Процедуру повторяют еще раз со 2-й и 3-й пробирками. Затем их содержимое выливают в стерильные чашки Петри.

- После застывания среды засеянные чашки Петри инкубируют в термостате при 28<sup>0</sup>С в течение 2 суток.

### ***Метод разведения в жидких средах***

- В 1 пробирку, содержащую 10 мл жидкой среды Доберейнер, бактериальной петлей вносят накопительную культуру бактерий и тщательно перемешивают.

- Далее пипеткой, объемом 1 мл, проводят ряд десятикратных разведений.

- Из полученных разведений по 200-500 мкл суспензии высевают в чашки Петри с агаровыми пластинками (среда Доберейнер).

- Засеянные чашки Петри инкубируют в термостате при 28<sup>0</sup>С в течение 2 суток.

### ***Метод Дригальского***

Для выделения чистой культуры бактерий данным методом используют первую пробирку с микроорганизмами, полученную при постановке предыдущего опыта.

- Из первой пробирки переносят 500 мкл суспензии на хорошо подсушенный агар Доберейнер в чашку Петри.

- Стеклоянный шпатель Дригальского стерилизуют фламбированием (погружают в 96% этиловый спирт, затем на несколько секунд вносят в пламя горелки). После чего шпатель охлаждают о внутреннюю сторону крышки чашки Петри, куда проводят засев микроорганизмов.

- Суспензию микроорганизмов тщательно втирают шпателем в агаровую пластинку в первой чашке.

- Затем, не стерилизуя шпатель, протирают агаровые пластинки второй и третьей чашек Петри.

- Засеянные чашки Петри инкубируют в термостате при 28<sup>0</sup>С в течение 2 суток.

### ***Метод истощающего штриха***

- Готовят несколько агаровых пластинок в чашках Петри.

- Бактериальной петлей набирают небольшое количество исследуемой накопительной культуры микроорганизмов.

- Петлю ставят плашмя у края чашки Петри и суспензию втирают в агар в этом месте.

- Затем стерилизуют петлю, остужают ее о крышку чашки Петри и с поверхности агаровой пластинки, где втирали культуру, начинают посев штрихом по чашке в виде секторов, поворачивая петлю каждый раз на 90<sup>0</sup>. После засева каждого сектора рекомендуется стерилизовать бактериальную петлю.

## ***Собственно получение чистой культуры и проверка ее на чистоту***

- После инкубирования просматривают все посевы микроорганизмов в чашках Петри. Отмечают единичные колонии, определяют однородность культуры.

- Для доочистки все отличающиеся (или один искомый) морфотипы колоний высевают на богатую питательную среду (бобовый агар) методом истощающего штриха.

## ***Лабораторная работа №4 Методы культивирования и проверки культуры бактерий на чистоту***

Методы культивирования можно подразделить по типу используемой питательной среды – культивирование в жидких, полужидких и на плотных средах; по типу условий культивирования – аэробное, микроаэрофильное и анаэробное; а также на обычное, строгое и специальное; по типу используемого оборудования и посуды (емкости) и т.д. При выполнении данной лабораторной работы, которая является продолжением предыдущих, познакомимся с различными методами и способами культивирования, а также с методами оценки чистоты полученной культуры.

Оборудование и материалы: колбы конические плоскодонные (колбы Эрленмейера), стеклянные матрацы, чашки Петри, пробирки микробиологические с ватно-марлевыми пробками, пробки резиновые (стерильные), пипетки, анаэроостат, шейкер и круговая лабораторная качалка, термостат, вакуумный насос, эксикатор, поглотитель кислорода, микроскопы, предметные стекла, набор красителей, среды – МПА, МПА+СА, бобовый агар.

### **Ход работы**

1. Культивирование азотфиксаторов ведут при пониженном парциальном давлении кислорода, т.к. кислород ингибирует нитрогеназу. Самый простой способ достижения микроаэрофильных условий – это культивирование в большом количестве среды без перемешивания (в пробирки наливают 10 мл полужидкой среды и осуществляют посев культуры уколом). Иногда питательную среду дополнительно

регенерируют с помощью нагревания и быстрого охлаждения, при этом кислород удаляется и не успевает раствориться в среде.

2. Полученную предварительно накопительную культуру маслянокислых бактерий высевают штрихом на МПА, содержащий тиогликолат натрия и цистеин (для снижения  $E_h$  среды) в пробирку, либо глубинным посевом в эту же среду. Посевы можно инкубировать разными способами в анаэробных условиях. *Самым простым* является способ культивирования в эксикаторе с плотно притертой с помощью вазелина крышкой. Посевы помещают в эксикатор, ставят в него свечу, поджигают ее и плотно притирают крышку, при этом весь кислород расходуется на реакцию горения. *Другим способом* является культивирование в большом столбике среды в пробирках, закрытых герметично резиновыми пробками. Важно отметить, что маслянокислые бактерии (споровые) можно пересевать без соблюдения анаэробной техники и культивировать в описанных выше условиях. Большинство же других анаэробов требуют соблюдения техники (любой контакт с кислородом должен быть исключен) и более строгих условий культивирования – атмосфера инертного газа (содержит аргон и 5-10%  $CO_2$ ). Культивирование таких форм проводят в анаэроостате или  $CO_2$  – инкубаторах.
3. Порядок культивирования в анаэроостате:
  - Перед использованием анаэроостат вытирают снаружи и изнутри 3% перекисью водорода, высушивают, а затем обрабатывают 70% спиртом. Проверяют целостность резиновой прокладки и смазывают ее смазкой. Анаэроостат герметически закрывают, завинчивая все краны.
  - Затем подключают к вакуумному насосу. Включают насос и только теперь постепенно открывают вентиль «воздух–газ в камеру». Когда давление в анаэроостате упадет до  $-0,9$ , кран перекрывают. Насос выключают. Анаэроостат оставляют на 2-4 часа. Если в течение этого времени давление изменяется менее чем на 0,05, анаэроостат пригоден к работе.
  - После выполнения посевов чашки Петри или пробирки помещают в анаэроостат, предварительно прогретый в термостате до необходимой температуры. Проводят процедуру, описанную в пункте 2. Далее за несколько подходов давление доводят до  $\sim 1,0$  атм. После этого перекрывают кран «воздух–газ в камеру» и выключают насос. Важно! Давление в анаэроостате должно падать равномерно!

- Затем подключают анаэроустат к баллону с аргоном или азотом. Открывают медленно кран баллона, после этого начинают медленно открывать кран анаэроустата. Выравнивают давление до  $-0,1$ .
  - Затем перекрывают кран «воздух-газ в камеру» и кран баллона с газом. Подключают анаэроустат к баллону с  $\text{CO}_2$  и полностью выравнивают давление аналогично заполнению инертным газом.
  - Все вентили анаэроустата закручивают до упора и ставят его в термостат.
4. Лабораторное аэробное культивирование достаточно простое. Культуры в колбах Эрленмейера ставят на шейкер и культивируют заданное время при 150-300 об/мин. Пробирки можно культивировать на круговой лабораторной качалке, поставленной в термостат, при максимальных оборотах. Для иных задач, где не требуется строгого культивирования, посеы инкубируют в обычных условиях в термостате при заданной температуре.
5. Полученные «чистые» культуры проверяют на чистоту:
- Визуальный контроль: просматривают рост по штриху. Для дальнейшей работы оставляют культуры, рост которых однороден по всему штриху.
  - Микроскопический контроль: готовят препараты фиксированных окрашенных клеток. Применяют простой метод окраски – метиленовым синим или фуксином и окраску по Граму. Как правило, мазки должны быть однородны, допускается лишь небольшое варьирование размеров. Однако у бактерий с полиморфным типом жизненного цикла (например, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* и др.) такой метод контроля затруднителен.
  - Использование богатой среды (например, МПА, МПА+СА, бобовый агар и др.). Готовят суспензии культур и высевают их глубинным методом либо используют рассев петлей. Засеянные чашки Петри или пробирки инкубируют в течение 4-6 сут. Совпадение морфологии и микроскопической картины выросших колоний свидетельствует об их чистоте.
6. Единичные колонии отсевают на 2 косяка (бобовый агар, МПА или другую богатую среду для поддержания или хранения культуры) – рабочий косяк, с которого отбирают культуру для биотестирования и резервный, который хранят любым доступным способом.

## **Лабораторная работа №5**

### ***Изучение морфолого-культуральных свойств бактериальной культуры***

Первоначальная оценка морфологии и типа роста микроорганизмов на первичных средах очень важна. Необходимо проводить оценку морфолого-культуральных характеристик микроорганизмов на тех плотных средах, на которых их обычно культивируют и для которых есть стандартные описания в определителях микроорганизмов. Любые ключевые характеристики бактерий важны для их идентификации. Например, пигментация, образование слизистых колоний на полиуглеводных средах и отсутствие слизи на неуглеводных и пр. Также предварительное заключение о типе метаболизма дает оценка роста на жидких средах (аэробы обычно растут в виде поверхностных пленок, нестрогие анаэробы дают придонный рост, микроаэрофилы – пристеночный, а факультативные анаэробы – равномерное помутнение среды). В полужидких средах оценивают подвижность микроорганизмов. При выполнении лабораторной работы студенты должны научиться определять общие характеристики бактериального роста на жидких, полужидких и плотных питательных средах.

Оборудование и материалы: культуры микроорганизмов на разных питательных средах, бинокулярный микроскоп МБС-9, лупа, осветители, стандартная шкала цветов, линейка, прибор для подсчета колоний с разными светофильтрами.

#### **Ход работы**

1. Из рабочих культур делают посев уколом в жидкую, полужидкую (питательный агар и желатина) и на плотную среды (скошенный агар в пробирке и агаровые пластинки на чашках Петри).
2. Засеянные чашки Петри и пробирки инкубируют в термостате 24-48 ч при 37<sup>0</sup>С.
3. **Оценка роста на питательных средах.** Проводят описание колоний, с помощью шкалы цветов отмечают пигментацию колоний, реверзума и окружающего агара.

Различают поверхностные, глубинные и донные колонии, врастающие в среду, эродирующие и др. У поверхностных колоний обычно описывается:

*Форма колонии* – округлая, амёбовидная, ризоидная, нитевидная, складчатая, концентрическая, сложная и др.

*Размер колонии* – диаметр в мм; бывают точечные (менее 1 мм), мелкие (1-2 мм), средние (2-4 мм) и крупные (4-6 мм и более).

*Контуры края* – определяют при просмотре под лупой или бинокулярным микроскопом МБС-9. Различают ровные края и неровные:

- фестончатый;
- волнистый;
- эрозированный или зубчатый;
- бахромчатый или ворсинчатый;
- лопастный;
- реснитчатый;
- нитчатый;
- ветвистый.

*Поверхность колонии* – рассматривая под микроскопом или лупой, устанавливают следующие признаки: гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная, матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, тусклая, мучнистая, прозрачная, мутная (изучают в том числе в проходящих, косых и падающих лучах). Обычно гладкие обозначают буквой S (*англ. smooth*), а шероховатые – R (*англ. rough*). У гладких колоний клетки располагаются соприкасаясь своими боковыми поверхностями, а у шероховатых – накладываются друг на друга, особенно при формировании цепочек клеток.

*Рельеф колонии* – каплеобразный, куполообразный, плоско-выпуклый, плоский, конусообразный, изогнутый, кратерообразный, бугристый, с оттянутым или приподнятым центром, вырастающие в агар колонии и др.

*Цвет* – бесцветные (грязно-белые, молочно-мутные и белесые колонии относят к бесцветным) или пигментированные – кремовые, желтые (лимонно-, охристо-, золотисто-, грязно-желтые), оранжевые, сиреневые, красные, черные и др. Оценку цвета колонии проводят при сопоставлении со стандартной шкалой цветов. Особенно отмечают, диффундирует ли пигмент в субстрат; а при описании колоний актинобактерий также отмечают окраску субстратного, воздушного мицелия и спороносного слоя.

*Структура* – определяют в проходящем свете при малом увеличении и суженной диафрагме. Различают однородную, мелко- или крупнозернистую, струйчатую, гиалиновую, волокнистую структуры. Колонии бывают однородными (строение колонии одинаково во всех участках) и неоднородными (например, окрашенный центр и бесцветный край).

*Консистенция* – исследуют при прикосновении, взятии и растирании петлей по поверхности предметного стекла. Бывают пастообразные, вязкие и слизистые, тягучие, волокнистые или кожистые, хрупкие колонии. Отмечают также легкость снятия колонии со среды и след колонии.

#### **4. Оценка роста на полужидкой среде.**

Посев в питательный полужидкий агар в виде столбика проводят ровным уколом бактериальной иглы в непосредственной близости к стенке пробирки. При такой постановке удастся определить подвижность бактерий в виде распространяющейся зоны помутнения.

При оценке роста на питательной желатине отмечают тип разжижения (протеолитическая активность) и характер роста:

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| 1. Рост без разжижения: | 2. Рост с разжижением (после охлаждения): |
| - нитевидный;           | - кратеровидный;                          |
| - зернистый;            | - реповидный;                             |
| - сосочковидный;        | - воронкообразный;                        |
| - ворсинчатый;          | - конусовидный;                           |
| - древоидный.           | - слоистый;                               |
|                         | - полное разжижение.                      |

#### **5. Оценка роста на жидких питательных средах.**

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| 1. Тип поверхностного роста:                | 3. Придонный и пристеночный рост: |
| - кольцевой (пристеночный);                 | - мелкозернистый;                 |
| - тонко-пленчатый;                          | - пленчатый;                      |
| - хлопьевидный;                             | - хлопьевидный;                   |
| - пленчатый;                                | - крошковидный;                   |
| 2. Рост бактерий с равномерным помутнением: | - гомогенный;                     |
| - выраженность осадка;                      | - волокнистый и др.               |
| - наличие пленки;                           |                                   |
| - наличие хлопьев.                          |                                   |

## Лабораторная работа №6

### *Бактериальные стандарты мутности и работа с ними*

Стандарты мутности широко применяются в бактериологии с различными целями: подготовка инокулюма для засева, стандартизация числа клеток бактерий при определении их чувствительности к антибиотикам, выявление и изучение антимикробной активности химпрепаратов, экспресс-оценка мутагенности веществ, для оценки прироста биомассы бактерий в жидких средах, а также при подготовке культур для тонких биохимических исследований и др. Для соблюдения бактериального стандарта мутности пользуются отраслевым стандартным образцом ОСО 42-28-85-02, разработанным ГИСК им. Л. А. Тарасевича. С заводскими стандартами также необходимо сравнивать и стандарты, приготовленные в лаборатории.

Оборудование и материалы: суточные культуры микроорганизмов на скошенных и жидких питательных средах, стандартный набор материалов для лабораторного стола (набор красок и фиксаторов, петли, мостик и ванночка, емкости для отходов с дезинфицирующими веществами, предметные и покровные стекла и др.), стандарт мутности №5 и №10, хлорид бария сухой, концентрированная серная кислота, пробирки из одного набора, ФЭК или нефелометр, центрифуга, термостат.

### Ход работы

#### 1. Получение биомассы клеток.

Бактериальные суспензии или биомассу клеток получают способом смыва культуры с поверхности плотной агаризованной среды, либо путем отделения клеток от жидкой питательной среды с помощью центрифугирования.

1. Соблюдая правила асептики, в пробирку с культурой на скошенном агаре вносят 1-2 мл физиологического раствора или буфера.
2. Пробирку закрывают пробкой и, слегка взбалтывая, получают смыв культуры. Если таким способом не удастся получить смыв, тогда пользуются запаянной с одного конца пипеткой Пастера. Пипеткой механически снимают культуру с агара и диспергируют. Полученную суспензию необходимо проинкубировать 20-40 мин в термостате при оптимальной температуре, чтобы клетки хорошо разошлись.
3. Полученный смыв можно использовать для многих бактериологических процедур. Однако чаще необходимо очистить массу клеток от балластных веществ среды. Для этого смывы из

нескольких пробирок переносят в стерильные центрифужные пробирки, закупоренные плотной фольгой. С этого же момента начинают получение биомассы клеток с жидких культур.

4. Суспензию центрифугируют в зависимости от вида микроорганизма при 3000 – 10000 об/мин в течение 15-20 мин.
5. Затем супернатант сливают, добавляют новую порцию физиологического раствора, перемешивают суспензию и снова центрифугируют.
6. Затем проводят стандартизацию суспензии, как указано ниже.

## 2. Приготовление стандарта мутности по Мак-Фарланду.

1. Готовят 1%-е растворы  $BaCl_2$  и  $H_2SO_4$ , соблюдая правила работы с вредными веществами.
2. Подбирают пробирки из одинакового стекла и одного набора для приготовления стандарта мутности и бактериальной взвеси, подлежащей исследованию.
3. В пробирки для стандарта разливают 1% раствор  $H_2SO_4$  и к ней добавляют раствор 1%  $BaCl_2$  для получения общего объема 10 мл. Необходимые объемы растворов указаны в приведенной ниже таблице. Указаны шкала и соответствующее ей число клеток микроорганизмов.

4.

Шкала	Объем, мл		Соответствующее число клеток/мл	Взвесь, $\times 10^8$ клеток/мл
	1% $H_2SO_4$	1% $BaCl_2$		
0,5	9,95	0,05	$1 \times 10^8$	1,5
1	9,9	0,1	$3 \times 10^8$	3
2	9,8	0,2	$6 \times 10^8$	6
3	9,7	0,3	$9 \times 10^8$	9
4	9,6	0,4	$12 \times 10^8$	12
5	9,5	0,5	$15 \times 10^8$	15
6,7,8,9,10	<i>Шаги аналогичные</i>			

*Цифры представлены для клеток бактерий типа кишечной палочки*

5. Во вторую пробирку вносят приготовленную суспензию, которую необходимо стандартизировать.
6. Удерживая обе пробирки в руке за или в пламени горелки, в опытную пробирку, соблюдая правила асептики, по каплям добавляют стерильный физиологический раствор (или иной требуемый буфер) до тех пор, пока мутность суспензии не будет визуально соответствовать мутности выбранного стандарта.

7. Кроме приготовленного стандарта, чаще используют коммерческие стандарты мутности №5 и №10. Международный стандарт мутности, или стеклянный стандарт мутности, утвержденный Всемирной организацией здравоохранения как первичный эталон мутности для оптической стандартизации бактериальных взвесей. Он соответствует мутности взвеси бактерий Борде-Жангу (коклюшных бактерий), содержащей  $10^9$  клеток в 1 мл, т. е. равный 10 единицам мутности; представляет собой взвесь частиц стекла пирекс. Порядок работы с ним:
- изучают инструкции к набору;
  - ампулу тщательно перемешивают;
  - затем ампулу вскрывают;
  - содержимое переносят в одну из пробирок набора;
  - далее порядок действия аналогичен п. 2.4 и 2.5.

Если в инструкции не указано иного, то 10 ед соответствует количеству микроорганизмов в единице объема  $5 \times 10^8$ , а стандарт 5 ед соответствует количеству клеток в единице объема  $2,5 \times 10^8$ . Эти единицы справедливы для энтеробактерий, неферментирующих микроорганизмов, стафилококков и ряда других: при практически одинаковой оптической плотности нет существенных различий в числе бактерий в единице объема. Для других микроорганизмов, существенно отличающихся по размерам, необходимо дополнительно уточнять единицы. Так, для грибов рода *Candida* при 0,5 ед Мак-Фарланда или 5 ед МСМ содержится микробных клеток в 30 раз меньше, чем для энтеробактерий.

### **3. Определение числа бактерий в 1 мл методом секторных посевов.**

1. Калиброванной бактериальной петлей (диаметр 2 мм, емкость 0,005 мл) производят посев исследуемой культуры или суспензии исследуемого материала (мочи) на первый сектор агара на чашки Петри, сделав около 40 штрихов.
2. Затем петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из первого сектора в сектор 2, из сектора 2 в сектор 3, из сектора 3 в сектор 4. **Важно.** После засева каждого сектора петлю необходимо прожигать.
3. Чашки инкубируют вверх дном 24 ч, после чего подсчитывают количество колоний, выросших в разных секторах, и

определяют число бактерий в 1 мл по таблице. Этот метод принят для определения степени бактериурии (число бактерий в 1 мл мочи).

Число колоний в секторах				Число бактерий в 1 мл
1	2	3	4	
1-6	–	–	–	Менее $1 \times 10^3$
8-20	–	–	–	$3 \times 10^3$
20-30	–	–	–	$5 \times 10^3$
30-60	–	–	–	$1 \times 10^4$
70-80	–	–	–	$5 \times 10^4$
100-150	5-10	–	–	$1 \times 10^5$
Сливной рост	20-30	–	–	$5 \times 10^5$
Сливной рост	40-60	–	–	$1 \times 10^6$
Сливной рост	100-140	10-20	–	$5 \times 10^6$
Сливной рост	Сливной рост	30-40	–	$1 \times 10^7$
Сливной рост	Сливной рост	60-80	Единичные колонии	$1 \times 10^8$

### Лабораторная работа №7

#### *Изучение микроорганизмов в окрашенном виде. Изучение тинкториальных свойств и выявление различных структур бактериальной клетки*

Приготовление мазков, давленных препаратов и висячей капли, а также виды фиксации и способы окраски по Граму, спор по Пешкову, липидных, углеводных и полифосфатных включений уже изучались как в общем курсе «Микробиология», так и спецпрактикуме «Техника микробиологических исследований». Поэтому в данной лабораторной работе приведены наиболее используемые методы светлорольной и темнорольной микроскопии и техники окрасок.

Оборудование и материалы: суточные культуры микроорганизмов на скошенных питательных средах, микроскопы, осветители, стандартный набор материалов для лабораторного стола (набор красок и фиксаторов, петли, мостик и ванночка, емкости для отходов с дезинфицирующими веществами, предметные и покровные стекла и др.).

## Ход работы

- 1. Определение подвижности.** Подвижность бактерий можно оценить в препарате «раздавленная капля». После приготовления препарат микроскопируют. Затем прибавляют к одному краю каплю карболовой кислоты и снова микроскопируют. Отсутствие движения бактерий (за исключением броуновского движения) говорит о том, что культура подвижна. Такой метод не применим для культур патогенных бактерий. Подвижность патогенных бактерий оценивают по росту в полужидких средах после посева уколом в столбик среды.
- 2. Определение морфологии клеток и их размеров.** Обычно проводят в окрашенных разбавленным метиленовым синим препаратах, т.к. большинство других методов окраски может значительно повлиять на морфологию и размеры клеток. Учитывают размер клеток – длину и ширину (с помощью окуляр-микрометра, предварительно определив его цену деления по объект-микрометру), общую морфологию клетки, тип концов и др.
- 3. Окраска по Граму (классический метод).**
  - Приготовить стандартный мазок (тонкий).
  - Зафиксировать в пламени горелки.
  - На мазок положить полоску фильтровальной бумаги.
  - Нанести первый краситель – *генциан-виолет* – так, чтобы бумага была полностью увлажнена и «блестела». Выдержать 4-5 мин.
  - Затем снять бумагу петлей и, не промывая мазок, нанести несколько капель раствора Люголя. Выдержать до 1 мин (препарат должен потемнеть, но не почернеть).
  - Раствор Люголя слить. Препараты опустить в ванночку с 96<sup>0</sup> этиловым спиртом на 45 сек. При этом каретку несколько раз приподнимают и опускают.
  - Препарат промыть до «чистой воды»
  - Нанести второй краситель – *фуксин* – на 1-2 мин.
  - Препараты промыть и подсушить.
  - *Грамположительные бактерии – сине-фиолетовая окраска (1-й краситель).*
  - *Грамотрицательные бактерии – красно-розовая окраска (2-й краситель).*

Существуют различные модификации дифференциального метода окраски клеточных стенок бактерий. Их целью является «более точная идентификация» типа клеточной стенки в специальных случаях (например, для отдельных видов микроорганизмов). Чаще всего вместо фуксина в качестве второго красителя используют *сафранин*, при этом клетки грамотрицательных бактерий окрашиваются в оранжево-розовый цвет, что позволяет четче их различить.

#### 4. Окраска спор по Ожешко.

- Приготовить стандартный мазок (толстый, у одного края стекла).
- На высушенный нефиксированный препарат нанести несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогреть 1-2 мин над пламенем горелки до закипания. Остаток кислоты слить.
- Дать стеклу остыть. Промыть. Подсушить и зафиксировать в пламени горелки.
- Окрасить карболовым фуксином Циля с подогреванием до появления паров.
- Затем стекла охладить и поместить в ванночку с 5% серной кислотой для обесцвечивания на несколько секунд.
- Промыть водой.
- Докрасить препарат метиленовым синим по Леффлеру.
- *Споры окрашиваются в красно-розовый цвет, клетки – в синий.*

#### 5. Окраска спор методом Дорнера.

- Мазок высушить на воздухе.
- Зафиксировать над пламенем горелки.
- Мазок покрыть полоской фильтровальной бумаги и пропитать карболовым фуксином Циля до «блеска».
- Стекло подогреть над пламенем горелки в течение 10 мин.
- Удалить фильтровальную бумагу и на мазок нанести смесь Никифорова на 1 мин.
- Мазок промыть водой и подсушить.
- На предметное стекло с мазком нанести насыщенный раствор нигрозина. *Вегетативные тела – бесцветные, споры – красные, фон – черный.*

## **6. Выявление кислотоустойчивости. Окраска по Цилю-Нильсену.**

- Приготовить стандартный мазок (у одного края стекла).
- Зафиксировать в пламени горелки.
- Нанести карболовый фуксин Циля и подогреть стекло над пламенем горелки до появления паров, но не до кипения красителя.
- Дать препарату остыть. Промыть.
- Препарат поместить в ванночку с 5% серной кислотой или 96° этиловым спиртом с 3% соляной кислоты по объему. Длительность обесцвечивания 3-5 с. При этом препарат несколько раз погружают в раствор и вынимают.
- Препарат тщательно промыть водой.
- Докрасить препарат метиленовым синим по Леффлеру 3-5 мин.
- Препарат промыть, подсушить.
- *Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в ярко-красный цвет, а некислотоустойчивые приобретают цвет второго красителя (синий).*

## **7. Выявление кислотоустойчивости. Окраска по Бунге-Траутенроту.**

- Стекло с мазком поместить в ванночку с абсолютным спиртом для экстракции липидов на 3 часа.
- Извлечь стекло и погрузить на 15 мин в раствор 1н хромовой кислоты ( $H_2CrO_4$ ).
- Затем извлечь и промыть препарат водой.
- Окрасить при подогревании фуксином Циля.
- Обесцветить в 10% серной кислоте в течение 3 минут.
- Докрасить насыщенным спиртовым раствором метиленового синего или синькой Леффлера 5 мин.

*Применяют для окрашивания осадка мочи при дифференциации *M. tuberculosis* (малиновый цвет) и менее кислотоустойчивых *M. smagmatis* (синий цвет второго красителя). Этот метод может быть арбитражным при установке степени кислотоустойчивости различных актинобактерий.*

## **8. Методика окраски спор по Шефферу-Фултону.**

- Фиксированный мазок покрыть кусочком фильтровальной бумаги, на который нанести 0,5% водный раствор малахитового зеленого и 2–3 раза нагреть в пламени спиртовки до появления паров.

- Фильтровальную бумагу снять, препарат промыть водой в течение 30 с и докрасить 0,5 % раствором сафранина.
- Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой. *Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетка – в красный.*

### **9. Выявление капсул по модифицированному методу Гинса-Бурри.**

- На предметное стекло нанести каплю водного раствора фуксина, в которую с помощью стерильной петли внести исследуемую культуру бактерий.
- Рядом с первой каплей поместить каплю туши. Две капли смешать и с помощью другого предметного стекла сделать мазок, как и мазок крови (ребром одного стекла проводят по поверхности другого).
- Мазок высушить на воздухе.
- Микроскопировать, пользуясь иммерсионной системой. *На темно-дымчатом фоне препарата видны розовые клетки микроорганизмов, окруженные бесцветной капсулой.*

### **10. Выявление капсульных и некапсульных бактерий с использованием темнопольной микроскопии.**

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта косыми лучами света. При таком освещении лучи не попадают в объектив, поэтому поле зрения выглядит темным. Если в исследуемом препарате содержатся клетки микроорганизмов, то косые лучи отражаются от их поверхности, отклоняются от своего первоначального направления и попадают в объектив. На интенсивно черном фоне видны сияющие объекты.

- Установить освещение по Кёллеру.
- Заменить конденсор Аббе на темнопольный параболоид-конденсор.
- Максимально открыть диафрагму осветителя.
- Приготовить препарат по типу «раздавленная капля».
- Нанести каплю иммерсионного масла на верхнюю линзу конденсора.
- Закрепить препарат лапками на предметном столике.
- Поднять конденсор до соприкосновения масла и предметного стекла так, чтобы масло разошлось тонким слоем.
- Установить объектив малого увеличения.

- Отцентрировать светлое пятно с темным центром с помощью винта-регулятора конденсора, а ее интенсивность за счет поднимания и опускания конденсора.
- Перевести револьвер на необходимый для работы объектив.
- Дополнительно отрегулировать конденсор и освещение.

### **11. Выявление жгутиков при окраске по Хью-Лейфсону.**

Для окраски жгутиков используют клетки, выращенные на поверхности скошенного агара. Бактериальной петлей отбирают клетки, находящиеся у конденсационной воды.

- Полпетли культуры микроорганизмов осторожно перенести в стерильную забуференную дистиллированную воду, при этом температура воды должна быть такой же, как и температура инкубирования бактерий на скошенном агаре. Бактерии с петли не стряхивать, а петлю осторожно погружать в воду и ждать, пока культура «разойдется».
- Пробирку с бактериями оставить при комнатной температуре на 30 мин.
- Использовать химически чистое (вымытое в хромовой смеси) стекло, на которое нанести 2-3 капли суспензии микроорганизмов.
- Суспензию распределить по поверхности стекла, осторожно его наклоняя.
- Высушить на воздухе и на 30 мин залить красителем Лейфсона. Краситель Лейфсона: 1,5% раствор хлористого натрия, 1,2% раствор основного фуксина, 3% раствор таниновой кислоты. Все растворы готовят отдельно и смешивают в равных соотношениях только перед употреблением.
- Затем препарат тщательно промыть водой, высушить и микроскопировать с иммерсией. *Жгутики имеют вид темно-красных прямых образований.*

## **Лабораторная работа №8**

### ***Основные тесты дифференциации для бактерий***

Основным результатом работы к данному этапу является 1) выделение чистой культуры бактерий, 2) описание ее культурально-морфологических свойств, 3) четкое и достоверное отнесение

составляющих ее клеток к грамотрицательным или грамположительным. Используемые для идентификации тесты весьма разнообразны, некоторые из них необходимы для идентификации многих групп бактерий, в других случаях – их постановки не требуется. Постановка биохимических тестов требует особенной тщательности и внимания при приготовлении используемых сред, постоянного контроля за чистотой выделенной идентифицируемой культуры, повторения (независимого) каждого теста не менее 2-х раз, использования при постановке тестов культур с заведомо положительной и отрицательной реакцией. Учет результатов при постановке физиолого-биохимических тестов проводится в течение 24-96 часов (если нет особых указаний).

Оборудование и материалы: суточные культуры микроорганизмов на скошенных питательных средах, микроскопы, осветители, стандартный набор материалов для лабораторного стола (набор красок и фиксаторов, петли, мостик и ванночка, емкости для отходов с дезинфицирующими веществами, предметные и покровные стекла и др.), наборы реактивов для постановки биохимических тестов.

### **Ход работы**

#### **1. Тесты на выявление оксидазы.**

Принцип метода. Метод основан на способности оксидаз бактерий переносить электроны от доноров на химические акцепторы с использованием кислорода. Вещество вводят в виде бесцветного вещества, которое окисляется до окрашенного продукта (визуализация реакции). Использование нихромовых петлей не рекомендуется, в связи с тем, что присутствие окарины повышает частоту ложноположительных реакций.

#### ***Метод Ковача (1 вариант)***

- на суточную культуру, выращенную на питательной среде, прилить реактив Ковача (*N,N*-тетраметил-*n*-фенилендиамин);
- реактив распределить тонким слоем по всей площади культуры, покачивая чашки Петри или пробирки;
- через 10-30 с колонии бактерий, продуцирующих цитохромоксидазу, из бесцветных превращаются в синие, темно-фиолетовые (образуется соединение «вурстеровский синий»).

#### ***Метод Ковача (2 вариант)***

- в чашку Петри налить реактив Ковача;
- полоску фильтровальной бумаги поместить в реактив и пропитать до влажного состояния;

- пропитанную реактивом бумагу поместить на предметное стекло;
- запаянной пастеровской пипеткой нанести исследуемую культуру в виде мазка;
- *через 20-30 с оксидазоположительные культуры приобретают синюю окраску.*

### ***Метод Габу-Хадли (Gaby-Hadley)***

Техника и варианты постановки аналогичны вышеописанному методу Ковача; при этом используется следующий реактив, выполняющий роль искусственного акцептора электронов: 1% водный раствор *N,N*-диметил-*n*-фенилендиамина с 1% раствором  $\alpha$ -нафтола на 96% этаноле (1:1). *При этом образуется соединение индофенол синий, и колонии приобретают синий цвет.*

## **2. Тест на выявление каталазы.**

Принцип метода. При контакте перекиси водорода с каталазой начинается ее расщепление, сопровождающееся выделением пузырьков кислорода:



***Способ 1.*** На поверхность суточной культуры исследуемого микроорганизма наносят тест-реактив – свежеприготовленный 3% раствор перекиси водорода – так, чтобы он покрыл поверхность культуры тонким слоем.

***Способ 2.*** На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю тест-реактива и петлю исследуемой культуры.

*Наступление газообразования (бурное или умеренное) в течение 2-5 с расценивается как положительная реакция.*

*Появление небольшого количества единичных пузырьков после 10-15 с расценивают как сомнительную.*

## **3. Тест на окисление-брожение (OF-тест (oxidation/fermentation) или Хью-Лейффсона).**

При изучении утилизации микроорганизмами углеводов необходимо:

- установить сахара и их производные, которые используются микроорганизмами (тесты на ассимиляцию углеводов);
- определить, каким путем (окисление или брожение) утилизируется углевод.

Принцип метода. При окислении веществ углеводы расщепляются полностью с образованием воды и небольшого количества углекислоты

(нейтральные продукты), а при брожении образуется большое количество газообразных веществ и происходит закисление среды (изменение цвета индикатора).

### Техника постановки

1. Готовят основной раствор углевода (обычно глюкозу), стерилизуют его автоклавированием при 0,5 атм или фильтрованием.
2. Добавляют его к основной среде в пробирках (4 мл), охлажденной до 50<sup>0</sup>С, до конечной концентрации 0,5-1%. Состав среды (г/л): пептон – 2, NaCl – 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1, бромтимолблау – 0,03, агар – 2, вода дистиллированная. Чаще используется другая среда (г/л): NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1, KCl – 0,2, MgSO<sub>4</sub> – 0,2, дрожжевой экстракт – 2,0 мл, бромтимолблау – 0,03, агар – 2,5, вода дистиллированная; рН 7,0. Стерилизуют при 115<sup>0</sup>С 20 мин. Допускается внесение и других добавок, способствующих росту бактерий.
3. Пробирки со средой с углеводом помещают на кипящую водяную баню для удаления кислорода при нагревании.
4. Затем их резко охлаждают, и столбики инокулируют культурой.
5. После инокуляции среду в первой пробирке (анаэробная, F) покрывают стерильным вазелиновым маслом на высоту 1-1,5 см. Вторую пробирку оставляют без изменений (аэробная, O).
6. Для контроля неспецифических реакций инкубируют стерильный незасеянный столбик, а также засевают столбик без углеводов.
7. Засеянные пробирки инкубируют в термостате при 36<sup>0</sup>С с ежедневным просмотром роста бактерий в течение 3-4 (до 7) суток.

### Учет результатов

Осуществляют по изменению цвета питательной среды (в зависимости от индикатора). Например, в данной работе:

Результат	Пробирка без масла	Пробирка с маслом
Положительный (окисление)	Желтый	Зеленый
Положительный (ферментация)	Желтый	Желтый
Отрицательный (углевод не используется)	Зеленый или синий	Зеленый

#### **4. Тест на ассимиляцию соединений углерода (углеводы, органические кислоты).**

Принцип метода. При способности микроорганизма ассимилировать (использовать) углевод в качестве единственного источника питания наблюдается интенсивный рост бактерий на данной среде.

##### **Техника постановки**

1. Готовят основной раствор углевода в виде 10% раствора (обычно глюкозу), стерилизуют его автоклавированием при 0,5 атм или фильтрованием.
2. Готовят основную питательную среду следующего состава (г/л): пептон – 1; NaCl – 2,5;  $K_2HPO_4$  – 1;  $MgSO_4$  – 0,2; агар – 15; вода дистиллированная; pH 7,0. Среду стерилизуют при 115<sup>0</sup>C 20 мин.
3. Для контроля используют эту же питательную среду без углевода.
4. Стерильный раствор углевода добавляют к основной стерильной агаризованной расплавленной среде, охлажденной до 50<sup>0</sup>C, до конечной концентрации 0,5-1%. При необходимости в среду можно вносить ростовые факторы.
5. Затем среду аккуратно перемешивают в колбе и разливают по стерильным чашкам Петри. После застывания среды дно чашки расчерчивают на 6-8 секторов.
6. В каждый сектор засевают одну испытуемую суточную культуру бактерий.
7. Также используют внутренний контроль – теми же культурами засевают среду без углеводов.
8. Засеянные и перевернутые вверх дном чашки Петри инкубируют в термостате при оптимальной температуре (от 28-32<sup>0</sup> до 36-37<sup>0</sup>C) от 2 до 10 суток.

##### **Учет результатов**

Результат оценивают по интенсивности роста культуры на данной среде с углеводом по сравнению с контролем (среда без углевода).

##### **Другой вариант теста**

1. Диски фильтровальной бумаги пропитываются растворами исследуемых углеводов, сушатся на воздухе и стерилизуются в пробирках при 0,5 атм.
2. В чашку Петри с основной средой засеивается газон исследуемого микроорганизма.

3. Диски, пропитанные углеводами, раскладываются на засеянные чашки Петри в количестве не более 5 шт. на чашку.
4. О способности бактерий утилизировать углевод судят по интенсивности роста вокруг диска.

### **5. Тест на определение сахаролитических ферментов (пестрый ряд).**

Принцип метода. Если микроорганизм способен ассимилировать (использовать) углевод, введенный в питательную среду, наблюдается образование кислоты или кислоты и газа, определяемых по изменению цвета индикатора среды и накоплению газа в поплавках (трубки Дюрхема).

Как правило, используют сокращенный пестрый ряд на средах Гисса, который содержит глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит, фруктозу, арабинозу, мальтозу и галактозу.

Полный пестрый ряд: арабиноза, ксилоза, рамноза, глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза, лактоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, эскулин, салицин, сорбит, инозит, маннит, дульцит и некоторые другие.

#### **Техника постановки**

1. Готовят среду Гисса (г/л): пептон – 5; NaCl – 5;  $K_2HPO_4$  – 1; индикатор (10 мл индикатора Андрее или 1 мл 1,6% бромтимол блау), вода дистиллированная; рН 7,2. В среду для требовательных микроорганизмов добавляют сыворотку, дрожжевой экстракт, факторы роста и пр. После нагревания среду остужают и вносят исследуемые углеводы в конечной концентрации 1%.
2. Полученную среду разливают в пробирки по 5 мл, опускают поплавки (трубки Дюрхема) и стерилизуют при 0,5 атм. 15-20 мин.
3. Среда засевают одной бактериальной петлей суточной культуры или 0,5 млрд взвесью бульонной культуры в объеме 0,1 мл.
4. Засеянные пробирки инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для исследуемого микроорганизма.
5. Параллельно с опытными пробирками помещают 2 контрольные пробирки с посевами эталонных штаммов и незасеянную пробирку со средой Гисса.

#### **Учет результатов**

Просмотр посевов начинают через 24-48 ч (для быстрорастущих микроорганизмов) и на 10 сут (для медленно растущих микроорганизмов). Положительный результат реакции проявляется

изменением цвета среды в зависимости от индикатора (кислотообразование – малиновый, синий, желтый) и по наличию газа в поплавках.

<b>Индикатор</b>	<b>Положительная</b>	<b>Отрицательная</b>
Индикатор Андресе	розовый или малиновый	бесцветный
ВР (водно-голубой и розоловая кислота) в коммерческих средах	синий	бесцветный
Бромтимоловый синий	желтый	зеленый/синий

## **6. Определение типа ассимилируемого источника азота.**

Принцип метода заключается в том, что культуры бактерий засевают в среды идентичного состава за исключением источника азота, а затем оценивают наличие и интенсивность роста бактерий. Посев материала можно проводить как уколом в столбик, так и штрихом на поверхность скошенного агара.

### **Техника постановки**

1. Готовят плотную среду, содержащую основной фон (г/л): глюкоза – 20;  $K_2HPO_4$  – 1;  $MgSO_4$  – 0,5;  $NaCl$  – 0,5; агар – 15 г; pH 7,1-7,2. Среду готовят как обычно, а затем делят на четыре части. В одну вносят 1 г  $NH_4Cl$ , во вторую – 2,5 г  $CaCO_3$ , в третью – 1 г  $KNO_3$ , а в четвертую – 2 г пептона. Среду разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 1 атм 15 мин.
2. Засевают среды уколом (столбик), или штрихом (скошенный агар).
3. Посевы инкубируют 48 ч в термостате при 37<sup>0</sup>С. Для многих организмов температурный диапазон может быть в пределах 22-28<sup>0</sup>С, а срок инкубации продлен до 7-10 суток.

### **Учет результатов**

Результат как «положительный» указывают в том случае, если наблюдается видимый «хороший» рост культуры на данной среде. Многие микроорганизмы способны одновременно усваивать азот из всех типов источников. К ним относят, например, некоторых кишечных бактерий – *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.* (особенно штаммы, выделенные из почвы).

## **Лабораторная работа №9**

### ***Дополнительные тесты дифференциации бактерий***

Данная работа является логическим продолжением предыдущей. Представленные ниже тесты могут быть как дополнительными, так и основными при идентификации различных групп микроорганизмов. А в некоторых случаях они вообще не проводятся.

Оборудование и материалы: суточные культуры микроорганизмов на скошенных питательных средах, микроскопы, осветители, стандартный набор материалов для лабораторного стола (набор красок и фиксаторов, петли, мостик и ванночка, емкости для отходов с дезинфицирующими веществами, предметные и покровные стекла и др.), наборы реактивов для постановки биохимических тестов.

### **Ход работы**

#### **7. Тест на образование ацетилметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра [VP]).**

Принцип метода: При посеве бактерий на среду Кларка из глюкозы они образуют не кислоты, а ацетон или ацетилметилкарбинол, который и определяют в данном биотесте по образованию окрашенного в красный цвет продукта реакции. Тест используют очень часто, особенно при идентификации кишечной группы, бацилл, вибрионов и др.

#### **Техника постановки**

1. Готовят среду Кларка для тестов VP и MR (тест на кислотообразование, см. ниже). Состав среды (г/л): пептон (или МПБ) – 5;  $K_2HPO_4$  – 5 (для постановки реакции у бацилл берут 5 г NaCl); глюкоза – 5; вода дистиллированная; pH 7,0. Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм 20 мин.
2. Проводят посев тестируемой культуры в количестве 1 бактериальной петли в 2 параллельные пробирки.
3. Одну параллель инкубируют 2-е суток (для некоторых 5-7) при  $28^{\circ}C$ , а вторую – при  $37^{\circ}C$ .
4. По истечении срока инкубации 1 мл культуры переносят в другую пробирку, добавляют 0,6 мл 5% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола и перемешивают.
5. Затем добавляют 0,2 мл 40% водного р-ра КОН и снова перемешивают.
6. Пробирки инкубируют 16-60 мин, установив их наклонно для увеличения доступа кислорода.

Строго соблюдать указанный порядок внесения реактивов!

В щелочной среде в присутствии катализатора  $\alpha$ -нафтола ацетоин ( $\text{CH}_3\text{-CO-CHON-CH}_3$ ) окисляется до диацетила ( $\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$ ), который вступает в реакцию с аргинином и другими азотистыми основаниями пептона (в щелочной среде), образуя при этом азотсодержащие комплексы вишнево-красного цвета.

### Учет результатов

Положительный результат – ярко-розовое или вишнево-красное окрашивание, отрицательный результат – не изменяется цвет (иногда соломенно-зеленоватый цвет среды после добавления реактивов).

### 8. Тест на кислотообразование (MR-тест, methyl-red – метиловый красный).

Принцип метода. Тест основан на том, что некоторые бактерии при росте на средах, содержащих пептон и глюкозу (или другой сахар), расщепляют последний с образованием различных стабильных кислых продуктов (молочная, уксусная, муравьиная и др.), вызывая при этом смещение рН среды до 4,0-4,5. рН среды определяют по изменению окраски индикатора метилового красного (метилрот).

### Техника постановки

1. Используют культуры, которые выросли на среде Кларка (предыдущий тест).
2. В пробирки вносят по 2-3 капли спиртового раствора индикатора метилового красного.
3. Содержимое перемешивают и отмечают изменение окраски.

### Учет результатов

рН	2,5-5,0	5,2-5,5	6,0-7,0
Результат	Положительный (+)	Сомнительный ( $\pm$ )	Отрицательный (-)
Окраска	Ярко-розовая, красная	Светло-розовая, оранжевая	Желтая, желто-оранжевая

### 9. Тест на дезаминирование фенилаланина.

При дезаминировании аминокислот отщепляется аммиак и образуется  $\alpha$ -кетокислота. Реакции могут протекать и далее, при этом в среде накапливаются различные продукты катаболизма аминокислот. Во многих случаях аммиак подщелачивает среду.

Принцип метода. Тест основан на том, что микроорганизмы, вырабатывающие дезаминазу фенилаланина, при росте на питательных

средах, содержащих L-фенилаланин, подвергают его окислительному дезаминированию. При этом в среде накапливается фенилпируват, который качественно выявляют с реактивом  $\text{FeCl}_3$ . Образующееся комплексное соединение имеет зеленую окраску.

### **Техника постановки**

1. Суточную культуру засевают на скошенную агаровую среду с фенилаланином. Состав (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{NaCl}$  – 5, фенилаланин – 1-2, дрожжевой экстракт – 3 мл, агар – 12. рН 7,2-7,4. Разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.
2. Посевы инкубируют в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 суток.
3. По истечении срока культивирования на поверхность среды вносят 0,5 мл 10%  $\text{FeCl}_3$ , распределяя его по всему скошенному агару.

### **Учет результатов**

Через 2-5 мин среда приобретает интенсивный зеленый цвет – положительная реакция.

*Аналогично определяют дезаминирование триптофана.* При этом в состав среды вводят триптофан в таком же количестве, как и фенилаланин. В случае положительного результата после добавления хлорида железа окраска среды будет коричнево-красная.

### **Экспресс-метод**

1. Готовят густую суспензию культуры, смывая ее 0,5 мл забуференного раствора фенилаланина (200 мг фенилаланина на 0,1М фосфатном буфере рН 7,4 до 100 мл).
2. Взвесь инкубируют в термостате в течение 4 часов при  $37^\circ\text{C}$ .
3. Затем добавляют 0,1 мл 10% хлорида железа.
4. Через 30-45 сек оценивают реакцию. Положительный результат – окрашивание взвеси в светло-зеленый цвет.

## **10. Тест на образование индола (тест на триптофаназу).**

Принцип метода. Тест основан на том, что бактерии при росте на среде с триптофаном, расщепляют его с образованием индола, пировиноградной кислоты и аммиака. Конечный продукт – индол – определяют с использованием различных реактивов: чаще всего, при положительной реакции (присутствие индола в среде) проявляется розово-красное окрашивание.

Важно! Среда не должна содержать углеводов, нитратов и нитритов.

### **Техника постановки**

1. Половину бактериальной петли культуры засевают в пробирки с жидкой средой для выявления индолообразования. Состав среды Строгова (г/л): NaCl – 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,5; триптофан – 2,5 или другая среда (г/л): пептон – 10; NaCl – 5; вода дистиллированная. Среда разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм 15 мин.
2. Посевы инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 2-х суток.
3. По истечении срока инкубации определяют наличие индола в среде по одной из методик, которые представлены ниже.

### **Учет результатов**

#### ***Определение индола с реактивом Ковача***

1. Готовят реактив Ковача: *n*-диметиламинбензальдегид – 5 г; спирт амиловый – 75 мл; соляная кислота концентрированная – 25 мл.
2. Затем к 2 мл культуры прибавляют 0,5 мл реактива Ковача.
3. При положительной реакции появляется красно-вишневое окрашивание. При этом амиловый спирт экстрагирует индол и он вступает в реакцию с *n*-диметиламинобензальдегидом.

#### ***Определение индола с реактивом Эрлиха***

1. В пробирку с культурой приливают 1 мл ксилола и интенсивно перемешивают.
2. Затем ее помещают на 10 мин в термостат при 37<sup>0</sup>С. При этом происходит экстракция индола и расслоение среды. Вверху появляется слой ксилола.
3. Затем в пробирку в наклонном положении наслаивают 0,5 мл реактива Эрлиха: *n*-диметиламинбензальдегид – 1 г; спирт этиловый – 95 мл; соляная кислота концентрированная – 20 мл.
4. На границе раздела ксилол-среда при положительной реакции появляется красное кольцо. Данный вариант определения самый чувствительный.

#### ***Определение индола при помощи индикаторных полосок***

1. Заранее готовят индикаторные полоски по Морелю (1) или Гиллис (2). (1) Полоски 6×6,5 см погружают в насыщенный раствор щавелевой кислоты (12 г в 88 мл воды), налитый в крышку от чашки Петри. Пропитанные полоски сушат в шкафу при температуре 45-50<sup>0</sup>С, а затем нарезают на тонкие полоски шириной 0,5 см. (2) Готовят раствор для пропитывания полосок: диметиламинобензальдегид – 5 г; ортофосфатная кислота конц. –

10 мл; этиловый спирт – 50 мл. Полоски пропитывают и сушат аналогично варианту по Морелю, но раствор для пропитки прогревают.

2. После засева среды Строгова, полоски опускают в пробирку так, чтобы они не касались среды, и фиксируют их пробкой. При этом край полоски должен немного выступать из-под пробирки.
3. При положительной реакции индикаторные полоски приобретают розово-красный (по Морелю) или розово-сиреневый (по Гиллис) цвет.

#### ***Определение индола с нитритом натрия***

1. После окончания срока инкубации в пробирку со средой и выросшей культурой прибавляют 3-5 капель 30% серной кислоты и аккуратно ее перемешивают.
2. Затем в наклонном положении наслаивают 0,05% или 0,1% раствор  $\text{NaNO}_2$ .
3. В случае положительной реакции, через 2-12 мин появляется четкое интенсивно-красное кольцо.
4. Метод наименее чувствителен и специфичен. Поэтому всегда необходимо проводить оценку реакции в контрольной незасеянной пробирке, где может появляться слабое светло-красное кольцо.

### **11. Тест на уреазу (расщепление мочевины).**

Принцип метода. При гидролизе мочевины образуется аммиак, который подщелачивает среду, что приводит к изменению цвета индикатора.

#### **Техника постановки**

1. Культуру бактерий засевают на скошенный агар Кристенсена (г/л): пептон – 1;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2; глюкоза – 1; феноловый красный или бромтимолблау (0,2% или 1,6% раствор) – 6 мл; мочевина (50%) – 40 мл; рН 7,1. Основную среду стерилизуют при 0,5 атм 20 мин. Глюкозу и индикатор стерилизуют отдельно. Мочевину готовят на стерильной воде и в стерильной посуде в боксе и выдерживают 3 сут для самостерилизации. После автоклавирования основы к ней добавляют указанные компоненты и разливают в стерильные пробирки, среду затем скашивают.
2. Посевы инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

### **Учет результатов**

Положительный результат – изменение окраски среды с желтой в красную (феноловый красный), или с зеленой в насыщенно-синюю (бромтимолблау).

### **12. Тест на восстановление нитратов (нитратредукцию).**

Принцип метода. Накопление нитритов при инкубировании бактерий на нитратном агаре или с раствором нитрата выявляют с помощью реактива Грисса. Положительный результат (наличие нитритов) – появление красной окраски среды.

### **Техника постановки**

#### ***Вариант 1***

1. Культуру бактерий засевают на скошенный МПА.
2. Посевы инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 48 ч.
3. Готовят смыв культуры в 2 мл физиологического раствора.
4. 1 мл суспензии переносят в стерильную пробирку.
5. К этой суспензии добавляют 0,1 мл 10% KNO<sub>3</sub>.
6. Опытные пробирки инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 30-60 мин.
7. Затем в каждую пробирку вносят по 1 мл 1% реактива Грисса на 10% уксусной кислоте.

### **Учет результатов**

Положительный результат – появление в течение 1-5 минут розово-красной или вишнево-красной окраски среды.

#### ***Вариант 2***

1. Культуру бактерий засевают в жидкий нитратный бульон (г/л): KNO<sub>3</sub> – 0,2, пептон или МПБ – 5, вода дистиллированная. Среду готовят как обычно, разливают в пробирки по 5-6 мл, опускают поплавки (трубки Дюрхема) и стерилизуют при 1 атм 15 мин.
2. Посевы инкубируют в термостате при 35<sup>0</sup>С в течение 48 ч. Наблюдение за результатами проводят и на первые сутки.
3. Отбирают 1 мл суспензии и переносят его в стерильную пробирку.
4. К этой суспензии добавляют 1-2 капли реактива Грисса.

### **Учет результатов**

Наличие газа в поплавках свидетельствует о восстановлении нитратов до газообразного азота (N<sub>2</sub>) как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Появление в течение 1-5 минут розово-красной или вишнево-красной окраски среды после добавления реактива Грисса – положительная реакция. При сомнительных результатах тест ставят повторно, удлиняя при этом срок инкубации до 3-5 суток.

## **13. Протеолитические свойства бактерий**

### **А. Тест на разжижение желатины.**

Принцип метода основан на необратимом частичном или полном расщеплении желатины под воздействием экстрацеллюлярных протеаз бактерий.

#### **Техника постановки**

1. Культуру бактерий засевают уколом в столбик питательной желатины (г/100мл): МПБ – 2, желатина – 12-15 или 6 (для ускоренного результата). Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.
2. Посевы инкубируют в штативах в термостате при 37<sup>0</sup>С или 22-28<sup>0</sup>С в течение 1-7 суток. Для некоторых микроорганизмов период инкубации составляет 14 сут.
3. Параллельно с опытными ставят и контрольные (незасеянные) пробирки.

### **Учет результатов**

После окончания срока инкубации штативы аккуратно переносят в холодильник (+4 – +7<sup>0</sup>С) для застывания желатины. В контрольных пробирках желатина должна застыть так, чтобы при переворачивании пробирки столбик оставался интактным. Аналогичная ситуация в опытных пробирках – отрицательный результат. Жидкая консистенция среды после охлаждения (полная, либо частичная) – положительный результат.

### **Б. Тест на ферментативный гидролиз казеина.**

Принцип метода. Метод основан на расщеплении фосфопротеина молока (казеина) под воздействием экстрацеллюлярных протеаз бактерий. При этом на молочно-мутной среде появляются зоны просветления.

### **Техника постановки**

1. Культуру бактерий засевают истощающим штрихом на агаровые пластинки Эйкмана (г/л): МПБ или пептон – 10, NaCl – 5, глюкоза – 10, агар – 17, вода дистиллированная. Среду готовят как обычно и стерилизуют при 1 атм 15 мин. 300 мл свежего коровьего молока обезжиривают центрифугированием в больших флаконах при 3000-4000 об/мин 15 мин. Жир удаляют и снова центрифугируют. Молоко переносят в колбу и автоклавируют при 0,5 атм 15 мин. В расплавленную и охлажденную до 50<sup>0</sup> С основу вносят молоко, соблюдая правила асептики, и быстро разливают в стерильные чашки Петри. Часть среды готовят без агара, смешивают с молоком и разливают в стерильные пробирки.
2. Посевы в чашках и пробирках инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 1-2 суток. Для некоторых микроорганизмов период инкубации составляет 5 суток.

### **Учет результатов**

После окончания срока инкубации просматривают чашки и пробирки. Положительный результат: появление зон просветления вокруг колоний на среде в чашках и свертывание либо пептонизация казеина в пробирках. Чаще для выявления зон просветления на чашки наносят 0,5 мл 1% соляной кислоты и распределяют ее ровным слоем. В случае отсутствия зон просветления даже после обработки соляной кислотой, делают заключение об отрицательном результате теста.

### **14. Тест на образование сероводорода.**

Принцип метода. Метод основан на культивировании испытуемой культуры на питательных средах с источниками образования сероводорода (H<sub>2</sub>S) – серосодержащие аминокислоты (цистеин, метионин, цистин) или сульфаты и тиосульфаты. Индикатором на сероводород служат соли железа или свинца, которые образуют коричнево-черные преципитаты в виде сульфидов. Метод с использованием индикаторных полосок один из самых чувствительных.

### **Техника постановки**

1. Культуру бактерий засевают истощающим штрихом на скошенный агар Клиглера, TSI или Олькеницкого (для кишечной группы), уколом на среду Хоменко или в жидкую среду следующего состава (г/л): МПБ – 10, пептон – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2,

дрожжевой экстракт – 2 мл, вода дистиллированная. Среду готовят как обычно, разливают в пробирки по 8 мл и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин.

2. После засева жидкой среды, в пробирки подвешивают полоски, пропитанные ацетатом свинца. Готовят полоски и пропитывают их аналогично индикаторным полоскам на индол, при этом раствором для пропитки служит 20% водный раствор ацетата свинца с добавлением 1 г гидрокарбоната натрия или 2 мл ледяной уксусной кислоты. Пропитывание проводят 10-15 мин.
3. Посевы инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup> С в течение 18-48 ч.

### **Учет результатов**

Приготовленные полоски бесцветны. При образовании в среде сероводорода полоски начинают чернеть или буреть, начиная с нижнего края. В таком случае реакцию на сероводород считают положительной. На диагностических средах, которые очень часто используют в клинической практике (Клиглера, TSI или Олькеницкого, Хоменко), положительной реакцией является потемнение или почернение среды.

### **15. Тест на декарбоксилирование аминокислот.**

Принцип метода. Метод основан на культивировании испытуемой культуры на питательных средах, содержащих одну из аминокислот (например, лизин, орнитин, аргинин). Декарбоксилирование ведет к защелачиванию среды (образование аминов, аммиака и CO<sub>2</sub> и др.) и изменению цвета введенного в среду индикатора.

### **Техника постановки**

1. Культуру бактерий засевают уколом в столбик модифицированной среды Мюллера (контрольную и опытную) (г/л): МПБ – 5, глюкоза – 1, дрожжевой экстракт – 3 мл, 1% бромкрезоловый пурпурный или бромтимол блау – 2 мл, агар – 15, вода дистиллированная. Среду готовят как обычно, затем делят на четыре равные части. Первая – контроль (без аминокислот), во 2,3,4 вносят соответственно по 10 г лизина, орнитина и аргинина, растворяют и перемешивают. Выставляют pH 6,0±0,2. Разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 1 атм 15 мин.
2. Посевы инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup> С в течение 48 ч. Если в течение 2-х суток щелочность не нарастает, инкубацию продлевают до 4-х суток.

### Учет результатов

Результат	Бромтимоловый синий		Бромкрезоловый пурпурный	
	Контрольная пробирка	Опытная пробирка	Контрольная пробирка	Опытная пробирка
<b>Положительный</b>	Желтый цвет	Зеленый или синий	Лимонно-желтый	Светло-фиолетовый, фиолетовый
<b>Отрицательный</b>	Желтый цвет	Желтый цвет	Лимонно-желтый	Лимонно-желтый

## САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Часть специальных тестов будут разобраны и выполнены в соответствующих разделах «Базовые методы клинической и санитарной микробиологии», например:

1. Тест на редукцию метиленового синего и резазурина.
2. Тест на гидролиз крахмала, или тест на диастазную активность.
3. Тесты на утилизацию цитрата с использованием сред Кристенсена и Симмонса.
4. Тест на бактериальные фосфатазы.
5. Тесты на гемолизины.
6. Тест на лецитиназу и лецитовиттелазу.
7. Тест на плазмокоагуляцию.

### **Тесты, вынесенные на самостоятельную работу**

1. Тест с лакмусовым молоком, или «штормовая реакция».
2. Тест на редукцию ТТХ и тест на пероксидазу.
3. Тест ONPG и тест на гидролиз эскулина.
4. Тесты на утилизацию органических кислот и малоната.
5. Тест на гидролиз гиппурата натрия.
6. Тесты на ДНКазу и цистиназу (проба Пизу).
7. Тест на протеолиз яичного белка.
8. CAMP-тест и тесты на липазы.
9. Тесты на определение подвижности и тест на спорообразование.
10. Тест на определение оптимального температурного режима культивирования и температур роста.
11. Тесты на образование пиоцианина и флюоресцирующих пигментов на средах Кинга.

## **План подготовки бланка теста**

1. Название (полное и сокращенное).
2. Принцип теста и метода.
3. Прописи сред, реактивов и реагентов.
4. Техника постановки.
5. Учет результатов.
6. Культуры-свидетели.
7. Круг микроорганизмов, для идентификации которых используется тест.
8. Вариации, способы постановки и модификации тестов, их применение.

# **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

## **для проверки знаний**

### **по модулям и итогового контроля**

#### **Модуль 1**

1. Типы растворов и их приготовление. Матричные растворы.
2. Использование и особенности стерилизации факторов роста.
3. Типы загустителей для сред. Особенности их использования.
4. Типы питательных сред. Особенности использования коммерческих сред.
5. Селективные добавки и ингибиторы.
6. Принципы составления рецептур и приготовления сред.
7. Методики культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов.
8. Биофизические методы для получения накопительных культур.
9. Биохимические и биологические методы для получения накопительных культур.
10. Примеры комбинированных методов. Накопительные культуры для азотфиксаторов, лактобактерий и маслянокислых бактерий.
11. Методы получения чистых культур.
12. Способы проверки культур на чистоту.

#### **Модуль 2**

1. Описание культурально-морфологических характеристик культуры.
2. Определение цитологических особенностей бактерий.
3. Приготовление и использование красящих и индикаторных полосок.
4. Принципы постановки биотестов.
5. Методы определения сахаролитических и протеолитических свойств.
6. Определение типа метаболизации и способности к ассимиляции разных веществ (углеводы, органические кислоты и др.).
7. Определение продуктов жизнедеятельности бактерий – индола, сероводорода, ацетина, ацетона и др.
8. Определение газо- и кислотообразования.

9. Современные экспресс-методы идентификации бактерий по биотестированию. API-системы.
10. Принципы и схемы идентификации неизвестной культуры до рода.
11. Практическая систематика бактерий. Принцип построения и работа с определителем бактерий Берджи. Видовая дифференциация.
12. Политомный электронный определитель бактерий.
13. Методы непродолжительного хранения культур микроорганизмов.
14. Методы долгосрочного хранения культур микроорганизмов.
15. Преимущества и недостатки общепринятых методов хранения культур.

# ПРИЛОЖЕНИЕ

## 1. Фиксаторы для окрашиваемых мазков

### *Рецепт 1. Смесь Никифорова*

Смесь равных объемов этилового 96<sup>0</sup> спирта и сернокислого (наркозного) эфира. Время фиксации – 10-15 мин.

### *Рецепт 2. Жидкость Карнуа*

Ледяная уксусная кислота (CH <sub>3</sub> COOH)	– 10 мл
Хлороформ (CHCl <sub>3</sub> )	– 30 мл
Этиловый спирт (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	– 60 мл

Время фиксации – 10-15 мин.

### *Рецепт 3. Жидкость Буэна*

Формалин 40% коммерческий (HCHO)	– 10 мл
Ледяная уксусная кислота (CH <sub>3</sub> COOH)	– 2 мл
Насыщенный водный раствор пикриновой кислоты	– 30 мл

Время фиксации – 5-10 мин.

### *Рецепт 4. Соляно-кислый спирт*

Этиловый спирт (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	– 97 мл
Соляная кислота (HCl) 35-36%	– 3 мл

Время фиксации – 3-5 мин.

### *Рецепт 5. Фиксирующий раствор карболовой кислоты*

Танин	– 5 г
Карболовая кислота жидкая	– 1 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл

Время фиксации – 10-15 мин.

## 2. Краски и реактивы для окрашивания бактериальных препаратов

В основе приготовления многих красящих растворов лежит предварительное приготовление насыщенных спиртовых растворов красителя. При этом определенное количество порошка красителя вносят во флакон из темного стекла и заливают 96<sup>0</sup> этиловым спиртом. Перемешивают и ставят в термостат при 37<sup>0</sup>С на 24-48 ч.

Из насыщенных растворов готовят спирто-водные разбавленные рабочие растворы красок согласно рецептуре для каждого из методов.

### Метеленовый синий

#### *Рецепт 6. Насыщенный спиртовой раствор*

Метиленовый синий	– 8– 9 г
Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 100 мл

#### *Рецепт 7. Спирто-водный рабочий раствор*

##### *Пропись 1*

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор	– 1 мл
Вода дистиллированная	– 30 мл

##### *Пропись 2*

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор	– 1 мл
Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 10 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл

#### *Рецепт 8. Водный раствор метиленового синего (для витального окрашивания)*

Метиленовый синий	– 1,0 г
Вода дистиллированная	– 1000 мл

#### *Рецепт 9. Метиленовый синий по Леффлеру*

Раствор устойчив и хранится несколько лет во флаконах из темного стекла и с плотной пробкой. Во время хранения качество краски улучшается. При приготовлении краски все ингредиенты смешивают во флаконе так, чтобы он был заполнен наполовину. Закрывают его ватно-марлевой пробкой. Периодически перемешивая, настаивают раствор несколько месяцев.

*Пропись 1*

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор	– 30 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл
Калия гидроксид (KOH), 10 % раствор	– 0,1 мл

*Пропись 2*

Метиленовый синий, насыщенный спиртовой раствор	– 3,0 мл
Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 2,0 мл
Калия гидроксид (KOH), 10 % раствор	– 1,0 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл

**Кристаллический фиолетовый (или генциан-виолет)**

***Рецепт 10. Насыщенный спиртовой раствор***

Кристаллический фиолетовый	– 8-9 г
Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 100 мл

***Рецепт 11. Спирто-водный рабочий раствор***

Кристаллический фиолетовый, насыщенный спиртовой раствор	– 1 мл
Вода дистиллированная	– 10 мл

**Основной фуксин**

***Рецепт 12. Насыщенный спиртовой раствор***

Фуксин основной	– 8-9 г
Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 100 мл

***Рецепт 13. Спирто-водный рабочий раствор  
(cum praepero ex tempore)***

Фуксин основной, насыщенный спиртовой	– 1 мл
Вода дистиллированная	– 10 мл

***Рецепт 14. Основной фуксин  
Циля карболовый (феноловый)***

Фуксин основной, порошок	– 1,0 г
Фенол кристаллический	– 5,0 г
Глицерин	– 0,5 мл

Этиловый спирт 96 <sup>0</sup>	– 10 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл

Фуксин с фенолом растирают в ступке при добавлении глицерина. **Работа проводится только в вытяжном шкафу.** При растирании по 2-3 мл (порциями) прибавляют спирт. В гомогенную суспензию прибавляют воду при перемешивании. Затем раствор фильтруют через влажный бумажный фильтр во флакон из темного стекла, ополаскивая ступку и пестик несколькими порциями воды. Раствор стойкий.

### ***Рецепт 15. Фуксин Пфейффера***

Фуксин Пфейффера готовят разбавлением фуксина Циля 1:10 дистиллированной водой.

### **Нейтральный красный (нейтральрот)**

**Нейтральрот**, как и многие другие водные красители (хризоидин, сафранин), взвешивают в необходимом количестве (0,5 г, 1,0 г, 1,5 г на 100 мл воды), ссыпают в воронку с бумажным фильтром, установленном во флакон, и заливают кипящей водой. Раствор готов после полного фильтрования. Рабочие растворы готовят разбавлением водой 1:10.

### **Тушь для выявления капсул по методу Бурри**

#### ***Рецепт 16. Тушь для окраски капсул и слизи***

К одному объему туши прибавляют 3 объема воды. Перемешивают и переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют 15-20 мин при 2000-3000 об/мин. Затем супернатант резким движением сливают. Его автоклавируют при 0,5 атм 30 мин.

### **Краска для окрашивания зерен волютина (полифосфатов)**

#### ***Рецепт 17. Краситель Раскиной***

Карболовый фуксин Циля	– 4,0 мл
Метиленовый синий, насыщенный раствор	– 4,0 мл
Ледяная уксусная кислота (СН <sub>3</sub> СООН)	– 5,0 мл
Этиловый спирт 95 <sup>0</sup>	– 95 мл
Вода дистиллированная	– до 200 мл

## **Краска Романовского-Гимзы (коммерческая)**

### ***Рецепт 18. Краситель Романовского-Гимзы***

Краска сочетает в себе органический азур (из щелочного метиленового синего), эозин и метиленовый синий. Сухую краску растворяют в смеси метанола и глицерина (1:1). Раствор помещают на водяную баню на 4-6 ч при 60<sup>0</sup>С.

Таким образом получают насыщенный раствор краски. Часто он доступен в продаже. Затем краситель разбавляют 1:10 (1-2 капли на 1 мл) дистиллированной водой с *pH* 6,8-7,0. Изменение pH искажает результаты. Чаще лучше использовать фосфатный буфер с pH 6,8-6,9, разбавленный в 10-20 раз.

## **Раствор Люголя**

### ***Рецепт 19. Раствор Люголя***

#### *Пропись 1*

2 г калия йодида (KI) растирают в ступке, добавляя небольшими порциями 10 мл воды. Затем к полученной смеси добавляют кристаллический йод (I<sub>2</sub>) и оставляют ее на несколько часов до полного растворения. Затем доводят водой до 300 мл. Хранят во флаконе с темного стекла с притертой пробкой.

#### *Пропись 2*

2 г калия йодида (KI) растворяют в 200 мл воды и добавляют 1,5 мл спиртового раствора йода (5%), перемешивают и добавляют еще 100 мл воды. Раствор пригоден для окраски по методу Грама.

## **Изотонический (физиологический раствор)**

### ***Рецепт 20. 0,85% натрия хлорид***

8,5 г х.ч. натрия хлорида (NaCl) растворяют в 1000 мл дистиллированной воды в чистом химическом стакане. Раствор доводят до кипения, остужают и фильтруют через трехслойный бумажный фильтр. Устанавливают с помощью 0,1 N HCl или 0,1 N NaOH реакцию среды до pH 6,9-7,0 или pH 7,4-7,6 (для работы с кровью). Раствор разливают во флаконы по 200 мл и закупоривают плотной фольгой. Автоклавируют 30 мин при 1 атм. Затем, соблюдая правила асептики, заменяют фольгу на резиновые пробки, которые были простерилизованы в отдельном мешочке.

### 3. Кислотно-основные индикаторы

#### *Рецепт 21. Индикатор бромтимоловый синий*

Бромтимоловый синий	– 0,4 г
Гидроксид натрия, 0,1 N раствор	– 6,4 мл
Вода дистиллированная	– 100 мл

#### **Изменение цвета индикатора при изменении рН**

5,3-6,0	Лимонная
6,25-6,5	Желто-зеленая
6,7	Бледно-зеленая
6,9-7,0	Травянисто-зеленая
7,2-7,4	Синяя с зеленоватым оттенком
7,7-12	Насыщенная синяя

#### *Рецепт 22. Индикатор Андреде*

Фуксин кислый	– 1,0 г
Гидроксид натрия, 1 N раствор	– 64 мл
Вода дистиллированная	– 400 мл

Фуксин кислый растворяют в гидроксиде натрия, затем прибавляют 400 мл воды и настаивают 24 ч при 37<sup>0</sup>С. Затем выдерживают двое суток на свету при комнатной температуре. Хранят во флаконе из темного стекла с притертой пробкой.

#### **Изменение цвета индикатора при изменении рН**

5,3-5,5	Интенсивная красная
6,0-6,25	Красная
6,5-6,7	Розовая
6,9-7,0	Бледно-розовая
7,2-7,4	Окраска отсутствует (бесцветный)

## 4. Кислотно-основные буферы

Для приготовления буферов используют свежую дистиллированную воду. Ее кипятят для удаления карбонатов, сливают в чистую посуду и хранят плотно закупоренной. рН воды не должен выходить за рамки диапазона 5,8-6,9. Навески взвешивают с точностью до 0,001 г, растворяют в мерных колбах с половинным объемом воды, затем доводят до метки. Некоторые вещества необходимо нагревать для растворения. Для этого каждый компонент растворяют в отдельной посуде, нагревают и после полного растворения сливают в одну мерную колбу. Затем раствор доводят до метки и тщательно перемешивают (10-15 мин), переворачивая колбу. Буферные растворы хранят в чистой посуде из темного стекла при температуре 4-8<sup>0</sup>С не более 10-14 дней.

При выборе соответствующих буферных сред для культивирования бактерий исходят из: 1) подходящего значения рН буфера, 2) возможного ингибирующего или токсического действия буфера, 3) возможной утилизации компонентов буфера бактериальной культурой, 4) возможного связывания буфером катионов двух- и трехвалентных металлов. Для бактериальных ростовых сред наиболее широко используются фосфатный, трис-солянокислый, цитратный и ацетатный буферы. Эти буферные смеси охватывают практически весь интервал значений рН, в котором могут расти бактерии.

### ***Рецепт 23. Фосфатные буферные смеси (общие и микробиологические)***

*Пропись 1. Для питательных сред и ферментативных реакций*

<b>рН</b>	<b>5,91</b>	<b>6,24</b>	<b>6,47</b>	<b>6,64</b>	<b>6,68</b>	<b>6,98</b>	<b>7,12</b>	<b>7,38</b>	<b>7,73</b>	<b>8,04</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл									
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1/15 моль/л	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/15 моль/л	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	9,5

*Пропись 2. Для питательных сред и ферментативных реакций*

<b>pH</b>	<b>6,81</b>	<b>6,98</b>	<b>7,17</b>	<b>7,38</b>	<b>7,73</b>	<b>8,04</b>	<b>8,34</b>	<b>8,68</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл							
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/15 моль/л	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	9,5	9,75	9,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1/15 моль/л	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,25	0,1

*Пропись 3. Фосфатный буфер общего назначения калиевый 1 молярный*

<b>pH</b>	<b>6,0</b>	<b>6,2</b>	<b>6,4</b>	<b>6,6</b>	<b>6,8</b>	<b>7,0</b>	<b>7,2</b>	<b>7,4</b>	<b>7,6</b>	<b>7,8</b>	<b>8,0</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл										
1М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,2	19,2	27,8	38,1	49,7	61,5	71,7	80,2	86,6	90,8	94,0
1 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	86,8	80,8	72,2	61,9	50,3	38,5	28,3	19,8	13,4	9,2	6,0

Расчеты объемов для приготовления буферов также можно провести на Интернет-ресурсе molbiol.ru: [http://molbiol.ru/eng/protocol/01\\_02b.html#a48a](http://molbiol.ru/eng/protocol/01_02b.html#a48a)

**Рецепт 24. Трис-буферная смесь  
(трис-аминометан и HCl 0,2 mol)**

<b>pH</b>	<b>7,2</b>	<b>7,4</b>	<b>7,6</b>	<b>7,8</b>	<b>8,0</b>	<b>8,2</b>	<b>8,4</b>	<b>8,6</b>	<b>8,8</b>	<b>9,0</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл									
0,2 М Трис (24,2 г/л)	27,9	29,3	30,8	33,7	36,6	39,0	41,7	43,9	45,9	47,5
0,2 М HCl 17 мл/л; 1,19	22,1	20,7	19,2	16,3	13,4	11,0	8,3	6,1	4,1	2,5

**Рецепт 25. Боратная буферная смесь**

<b>pH</b>	<b>6,90</b>	<b>7,36</b>	<b>7,60</b>	<b>7,78</b>	<b>7,94</b>	<b>8,08</b>	<b>8,20</b>	<b>8,41</b>	<b>8,60</b>	<b>8,69</b>	<b>8,84</b>	<b>8,98</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл											
0,2 М H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> (12,4 г/л)	9,4	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	5,5	4,5	4,0	3,0	2,0

0,5 М Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O (19,06 г/л)	0,6	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,5	5,5	6,0	7,0	8,0
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**Рецепт 26. Цитратно-фосфатная буферная смесь**

<b>pH</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>5,0</b>	<b>5,2</b>	<b>5,4</b>	<b>5,6</b>	<b>5,8</b>	<b>6,0</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл							
0,2 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (35,6 г/л)	9,35	9,86	10,30	10,72	11,15	11,60	12,09	12,63
0,1 М лимон. к-та (21,01 г/л)	10,65	10,14	9,70	9,28	8,85	8,40	7,91	7,73
<b>pH</b>	<b>6,2</b>	<b>6,4</b>	<b>6,6</b>	<b>6,8</b>	<b>7,0</b>	<b>7,2</b>	<b>7,4</b>	<b>7,6</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл							
0,2 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (35,6 г/л)	13,22	13,85	14,55	15,45	16,47	17,39	18,17	18,76
0,1 М лимон. к-та (21,01 г/л)	6,78	6,15	5,45	4,55	3,53	2,61	1,83	1,27

**Рецепт 27. Ацетатная буферная смесь**

<b>pH</b>	<b>3,6</b>	<b>3,8</b>	<b>4,0</b>	<b>4,2</b>	<b>4,4</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>5,0</b>	<b>5,2</b>	<b>5,4</b>	<b>5,6</b>
Растворы	Соотношение растворов, мл										
0,2 М CH <sub>3</sub> COOH (11,55 г/л)	46,3	44,0	41,0	36,8	30,5	25,5	20,0	14,8	10,5	8,8	4,8
0,2 М CH <sub>3</sub> COONa (16,4 г/л)	3,7	6,0	9,0	13,2	19,5	24,5	30,0	35,2	39,5	41,2	45,2
Дистиллиро ванная вода	Довести общий объем до 100 мл										

## ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беркли Р., Бок Э., Бун Д., Бреннер Д., Хоулт Д., Криг Н., Снит П., Заварзин Г.А. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. Справочник: перев. с англ. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997.
2. Гудзь С. П. та ін. Практикум з мікробіології. Ч.1. – Львів: Вид-тво Львів. ун-ту ім. І. Франка, 2003 . – 80 с.
3. Дикий И. Л., Сидорчук И. И., Холупяк И. Ю., Шевелева Н. Е. Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям: Уч. пос. для вузов. – К.: Професіонал, 2004 . – 594 с.
4. Добровольская Т. Г. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. – М: Высш. школа, 1989. – 72 с.
5. Желдакова Р. А. Выделение и идентификация микроорганизмов. – Минск: Изд-во БГУ, 2003 . – 36 с.
6. Методы общей бактериологии: в 3-х томах / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983
7. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. и др. Практикум по микробиологии / Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
8. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г., Егоров, Н. С. и др. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: уч. для вузов. –3-е изд., перераб. и доп. – М.: Из-тво МГУ, 1995 . – 221 с.
9. Практична мікробіологія: Навч. посіб. для вузів / Климнюк С. І., Ситник І. О., Творко М. С., Широбоков В. П. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
10. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I / Под ред. Лабинской А. С., Волиной Е. Г. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008. – 1080 с.
11. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии / Под ред. В. К. Шильниковой. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
12. Benson H. J. Microbiological Applications A Laboratory Manual in General Microbiology, 8<sup>th</sup> edition. – 2002. – 496 p.
13. <http://www.som.soton.ac.uk/staff/tnb/pib.htm> – полнотомный электронный определитель бактерий с матрицами, которые соответствуют 9-му изданию определителя бактерий Берджи.

*ДЛЯ ЗАМЕТОК*

*Навчальне видання*

**Віннікова Ольга Іванівна**  
**Самойлов Андрій Михайлович**  
**Попова Юлія Вікторівна**

## **ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ**

Методичні рекомендації для студентів біологічного факультету  
спеціалізації «Мікробіологія та вірусологія»

(Рос. мовою)

Коректор *С. В. Гончарук*  
Комп'ютерне верстання *А. І. Полякова*  
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60x84/16 Умов. друк. арк. 1,9. Наклад 50 прим. Зам. № 93/11

Видавець і виготовлювач  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
61077, м. Харків, пл. Свободи, 4.  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009

Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна  
Тел. 705-24-32