

576.8
Е-41

Г. И. ЕЖОВ

Руководство к практическим занятиям по сельско- хозяйственной микробиологии





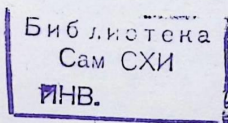
Г. И. Ежов

576.8
Е-41

Руководство к практическим занятиям по сельско- хозяйственной микробиологии

Издание второе,
переработанное и дополненное

Допущено Главным управлением высшего
и среднего сельскохозяйственного образования
Министерства сельского хозяйства ~~СССР~~
в качестве учебного пособия для студентов
высших сельскохозяйственных учебных
заведений по агрономическим специальностям



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1981

ББК 28.4

Е 35

Рецензенты:

кафедра микробиологии и вирусологии Ставропольского
ордена Трудового Красного Знамени сельскохозяйственного
института (зав. кафедрой проф. В. Ф. Глухов); кафедра бо-
таники и физиологии растений Оренбургского сельскохозяй-
ственного института (зав. кафедрой доц. В. Абаймов)

Ежов Г. И.

Е 35 Руководство к практическим занятиям по сель-
скохозяйственной микробиологии: Учеб. пособие
для студентов агрономических специальностей
высших сельскохозяйственных учебных заведений.
— 2-е изд., перераб. и доп.— М.: Высш. школа,
1981.— 271 с., ил.

В пер.: 60 к.

В пособии излагаются методические указания для проведения
лабораторных работ по курсу сельскохозяйственной микробиологии
с основными теоретическими сведениями по данной теме. Практиче-
ские работы посвящены вопросам общей и частной микробиологии
(морфологии и физиологии микроорганизмов; исследованиям микро-
флоры почвы, воды и воздуха; иммунитету и др.).

Второе издание учебного пособия (первое вышло в 1974 г.) суще-
ственно переработано: перераспределен материал второй главы, что
целесообразно в методическом отношении; в третью главу внесены
дополнительные разделы — «изменчивость микроорганизмов» и «гене-
тическая рекомбинация».

Предназначается для студентов агрономических специальностей.

Е 21007 — 389
001 (01)—81 61—81

3302010000

ББК 28.4
57 А

© Издательство «Высшая школа», 1974

© Издательство «Высшая школа», 1981, с изменениями

СОДЕРЖАНИЕ

	<i>Стр.</i>
Глава I. Организация, оборудование и правила работы в бактериологической лаборатории	5
Правила работы и поведения в лаборатории	9
Устройство микроскопа	10
Основные правила работы при микроскопии в светлом поле зрения	15
Микроскопия в темном поле зрения	17
Фазово-контрастная микроскопия	20
Люминесцентная микроскопия	23
Электронная микроскопия	25
Глава II. Морфология микроорганизмов и методы ее изучения	29
Морфология бактерий	29
Строение бактериальной клетки	32
Изучение микробов в окрашенном состоянии	42
Исследование микроорганизмов в живом состоянии	54
Морфология спирохет	57
Морфология актиномицетов	59
Морфология грибов	60
Морфология вирусов	75
Глава III. Общая физиология микроорганизмов и методы ее изучения	79
Питание микроорганизмов	79
Приготовление питательных сред	81
Стерилизация	89
Дыхание микробов	97
Техника посевов микробов на питательные среды	100
Устройство термостата	104
Методы выделения чистых культур аэробов	105
Изучение колоний и техника выделения чистых культур микробов	107
Выделение и культивирование чистых культур анаэробов	110
Идентификация выделенных культур	117
Изучение ферментов микробов	118
Изменчивость микроорганизмов	127

Глава IV. Исследование микрофлоры почвы, воды и воздуха	139
Микрофлора почвы	139
Определение микробов-антагонистов	147
Микрофлора воды	153
Микрофлора воздуха	160
Глава V. Превращение микроорганизмами соединений углерода	165
Спиртовое брожение	166
Молочнокислое брожение	171
Маслянокислое брожение	179
Брожение пектиновых веществ	185
Анаэробное разложение клетчатки	188
Аэробное разложение клетчатки	191
Глава VI. Превращение микроорганизмами азотистых соединений	195
Аммонификация белковых веществ	196
Нитрификация	203
Денитрификация	207
Глава VII. Превращение микроорганизмами молекулярного азота, соединений серы, фосфора	211
Свободноживущие в почве азотфиксаторы	212
Симбиотические азотфиксаторы	216
Превращение серы	221
Превращение фосфора	227
Глава VIII. Бактериальные препараты	230
Бактериальные удобрения	230
Использование микроорганизмов для борьбы с вредителями растений	237
Глава IX. Экологические методы исследования почвенных микроорганизмов	248
Изучение микронаселения почв	248
Определение доступных запасов калия и фосфора в почве микробиологическими методами	253
Глава X. Взаимоотношения микроорганизмов и растений	256
Методы выявления ризосферных микроорганизмов	256
Эпифитная микрофлора растений	259
Глава XI. Основы иммунологии	262
Литература	270

Глава I

ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБОРУДОВАНИЕ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Бактериологическая лаборатория представляет собой учреждение, имеющее специальное оборудование и штат подготовленных специалистов для производства микробиологических исследований.

По своему назначению производственные баклаборатории разделяются на клинко-диагностические (медицинские и ветеринарные), санитарно-эпидемиологические, гигиенические, ведомственные (при мясокомбинатах, молочных, хлебных и пивоваренных заводах, водонасосных станциях, станциях защиты растений), лаборатории по контролю за изготовлением бактериологических препаратов и пр.

Круг вопросов, которыми занимаются баклаборатории, определяется их назначением. Самыми важными разделами клинко-диагностических баклабораторий являются: микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний людей или животных, научная разработка новых методов лабораторной диагностики и эффективных мер борьбы с ними, подбор и проверка наиболее эффективных специфических (вакцины, сыворотки) и химических лечебно-профилактических препаратов при отдельных инфекционных заболеваниях.

Ведомственные баклаборатории занимаются контролем выпускаемой продукции на бактериальную загрязненность, разработкой мер обеззараживания пищевых продуктов, воды и кормовых средств от болезнетворных микробов: изучением и подбором наиболее эффективных штаммов микроорганизмов, используемых в соответствующей отрасли микробиологической промышленности.

Микробиологические лаборатории при сельскохозяйственных институтах и станциях занимаются изучением роли отдельных видов микроорганизмов в биохимических превращениях веществ в природе, в создании

структуры и плодородия почвы, в почвенном питании растений. Многие из этих лабораторий изучают возбудителей инфекционных заболеваний растений, разрабатывают методы их лабораторной диагностики и меры борьбы с ними.

В связи с большой спецификой исследований, проводимых различными по профилю лабораториями, их оборудование и режим работы совершенно различны. Однако общность методов, используемых для изучения микроорганизмов, предъявляет некоторые общие требования к организации микробиологических лабораторий и правилам работы в них.

Для изучения морфологии и ультраструктуры микроорганизмов, определения их принадлежности к тому или иному роду и виду, а также в целях определения свойств, функций и роли отдельных микробов в природных процессах используют следующие методы:

бактериоскопический (микроскопический), при котором в специально изготовленных препаратах (мазок, раздавленная капля и др.) под микроскопом изучают форму, размер, строение, отношение к окраске, подвижность микробов;

бактериологический, предусматривающий посев микробов на питательные среды, изолирование их отдельных видов друг от друга и изучение характера роста чистых культур на плотных или жидких питательных средах;

биохимический, позволяющий определить принадлежность выделенного микроба к тому или иному роду и виду по его биохимической (ферментативной) активности или выяснить роль микроорганизма, которую тот играет в круговороте веществ в природе;

серологический, основанный на идентификации (отождествлении) выделенных микробов и определении их видовой и типовой принадлежности по их антигенной структуре с помощью антител, содержащихся в иммунных сыворотках;

биологический, позволяющий отделить патогенных для людей, животных и растений микробов от сапрофитных. Он проводится путем заражения экспериментальных животных или растений микробом, выделенным в чистую культуру.

Для правильного функционирования всех микробио-

логических лабораторий исключительно важное значение имеет размещение и состав производственных помещений. Специфика микробиологических работ требует, чтобы помещение, отведенное под производственную лабораторию, было изолировано от других производственных и жилых объектов или, в крайнем случае, размещалось в отдельной секции здания с изолированным входом.

В состав производственной бактериологической лаборатории должны входить:

- 1) лабораторная комната для производства бактериологических исследований;
- 2) автоклавная (стерилизационная), в которой стерилизуют питательные среды, обеззараживают отработанный материал и зараженную посуду;
- 3) моечная, оборудованная для мытья посуды;
- 4) препараторская, приспособленная для подготовки лабораторной посуды и хранения питательных сред;
- 5) вегетационный домик для растений или виварий для содержания подопытных животных;
- 6) материальная комната для хранения запаса реактивов, посуды, аппаратуры и хозяйственного инвентаря.

При организации микробиологической лаборатории следует учитывать, что большинство микробиологических исследований требует условий, обеспечивающих стерильность работы и исключающих возможность загрязнения внешней среды и работающих патогенными микробами. Поэтому в комнате, предназначенной для бактериологических исследований, необходимо иметь застекленный бокс с предбоксом. Площадь бокса определяется объемом работ лаборатории и обычно не превышает 5—7 м². Для стерилизации в боксе устанавливают бактерицидные лампы (БУФ-15; БУФ-30).

Микробиологическая лаборатория должна быть оснащена необходимой мебелью: лабораторными столами, стульями или винтовыми табуретками, шкафами или закрывающимися полками для хранения посуды, питательных сред, реактивов и аппаратуры.

Для основного оборудования лаборатории обязательны термостаты для выращивания микробов, аппаратура для стерилизации (автоклав, сухожаровая печь Пастера, аппарат Коха для дробной стерилизации,

водяная баня, ультратермостат), бактериальные фильтры, центрифуги, аппарат для дистилляции воды, вакуумные насосы, холодильные установки для хранения музейных культур микроорганизмов и скоропортящихся препаратов, штативы для пробирок, эмалированные кастрюли, бачки, ведра и другая посуда, необходимая для варки питательных сред и кипячения отработанного материала, рН-метры, аналитические весы.

Кроме этого, в лаборатории необходимо иметь достаточное количество стеклопосуды и инструментов, используемых при микробиологических исследованиях (чашки Петри, пробирки, стекла предметные и покровные, пипетки пастеровские и градуированные, шпатели стеклянные, цилиндры, матрацы, колбы, ступки фарфоровые, петли бактериологические, пинцеты, ножницы разные, скальпели, лотки эмалированные и др.).

В микробиологической лаборатории должны быть в достаточном количестве сухие питательные среды различного назначения, набор химических компонентов, наиболее часто используемых для приготовления питательных сред, набор углеводов, красок и дезинфицирующих средств (хлорамин, фенол, едкий натр и др.), фильтровальная бумага, иммерсионное масло, спирт, эфир и другие реактивы и материалы.

Лабораторные столы с подведенными к ним электроэнергией, газом и водой размещают в лаборатории так, чтобы свет от окон падал спереди или сбоку от работающего, лучше с левой стороны. Для удобства дезинфекции поверхность лабораторных столов покрывают линолеумом, а еще лучше огне-кислотоустойчивым пластиком. На рабочем столе должны быть: осветитель, микроскоп, закрываемый стеклянным или хлорвиниловым колпаком, набор красок и реактивов для окраски микробов, газовая или спиртовая горелка, штатив для пробирок, бактериологическая петля, пастеровские и градуированные пипетки, шпатели (в стакане), предметные и покровные стекла, ванночка с мостиком для окраски микробов, сосуд с дезинфицирующей жидкостью (1%-ный раствор хлорамина или 3%-ный раствор фенола), иммерсионное масло, карандаши по стеклу, фильтровальная бумага, хлопчатобумажная салфетка, кусочек хозяйственного мыла для обезжиривания стекол, спички и пр. Стол бактериолога должен быть всегда чистым, а необходимые для работы предметы

аккуратно разложены на столе или в ящике стола. На столе не должно быть ничего лишнего, постороннего, загромождающего стол и мешающего работе.

Правила работы и поведения в лаборатории

Работники производственных бактериологических лабораторий и студенты на практических занятиях постоянно должны помнить, что они имеют дело с микроорганизмами, которые далеко не всегда могут быть безвредными для окружающей среды и здоровья человека. При неосторожном обращении с материалом, содержащим болезнетворные микробы, работник может заразиться сам или стать источником распространения инфекции. Поэтому при работе в бактериологической лаборатории или на практических занятиях по микробиологии необходимо всегда соблюдать следующие правила личной и общественной безопасности:

1. Работать в лаборатории в наглухо застегнутом халате и головном уборе (косынка, шапочка).

2. В помещении лаборатории не принимать пищу и воду, не курить, не допускать излишних разговоров и ненужных переходов.

3. Пользоваться только своим рабочим местом и прикрепленным к нему оборудованием.

4. Соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя. После окончания работы тщательно продезинфицировать и вымыть руки с мылом.

5. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и т. п. помещают в сосуд с дезинфицирующей жидкостью (1%-ный раствор хлорамина, 3%-ный раствор фенола). Пинцеты, бактериологические петли и некоторые другие металлические предметы прожигают в пламени газовой горелки.

6. Все использованные материалы (инфицированные растения, трупы животных, отработанные культуры микробов и т. д.) сжигать или обезвреживать стерилизацией в автоклаве. Эта работа проводится сотрудниками лаборатории.

7. Стол, одежду, обувь и другие предметы, случайно загрязненные исследуемым материалом или культурой микробов (разбилась пробирка, упала капля),

подвергают немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя.

8. После окончания работы поставить в термостат засеянные чашки и пробирки. Культуры микробов и остатки исследуемого материала сдать преподавателю, а рабочее место привести в порядок и продезинфицировать.

9. Производить влажную уборку и периодическую дезинфекцию всех рабочих помещений и стерилизацию оборудования.

Устройство микроскопа

Световой микроскоп — сложный оптический прибор, предназначенный для изучения в сильно увеличенном изображении мельчайших предметов, организмов и структур тканей, не видимых невооруженным глазом.

Микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения, проводить фазово-контрастную, люминесцентную и другие виды микроскопии. На рис. 1 и 2 представлены общий вид и схема микроскопа МБР-1.

Основные элементы конструкции современных световых микроскопов — механическая и оптическая части.

Механическая часть микроскопа состоит из подковообразного башмака 9, коробки с микромеханизмом 10, предметного столика 11, револьвера на салазках 14, кронштейна конденсора 15.

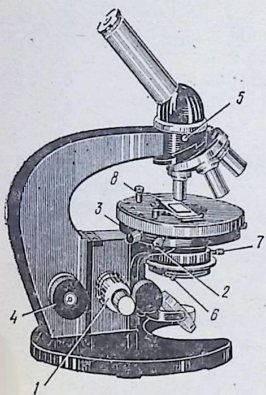


рис. 1. Общий вид микроскопа МБР-1:

- 1 — рукоятка микромеханизма, 2 — центрировочный винт для установки препарата, 3 — стопорный винт, 4 — рукоятка грубой фокусировки, 5 — винт для укрепления тубуса, 6 — рукоятка перемещения диафрагмы, 7 — стопорный винт конденсора, 8 — пружинные клеммы

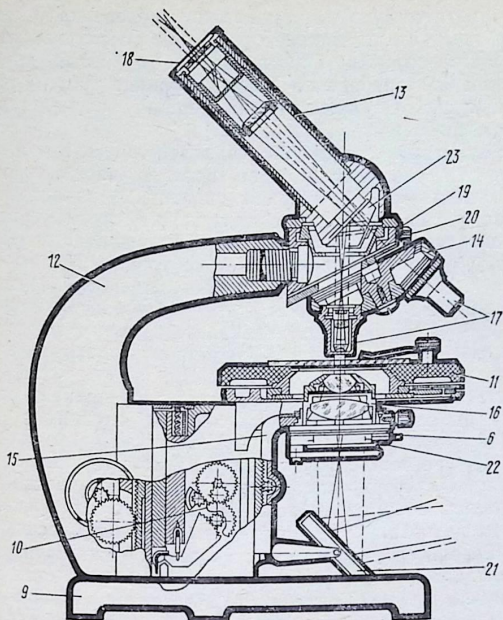


Рис. 2. Схема микроскопа МБР-1:

9 — башмак микроскопа, 10 — коробка с микромеханизмом, 11 — предметный столик, 12 — тубусодержатель, 13 — наклонный тубус, 14 — револьвер на салазках, 15 — кронштейн конденсора, 16 — конденсор, 17 — объектив, 18 — окуляр, 19 — головка тубусодержателя, 20 — винт для фиксации револьвера, 21 — зеркало, 22 — апертурная диафрагма, 23 — призма

Коробка микромеханизма несет, с одной стороны, направляющую для кронштейна конденсора, а с другой — направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа. На боковых поверхностях коробки расположены рукоятки микромеханизма 1, служащего для точной фокусировки объектива. Слева на оси рукояток закреплен барабан со шкалой, разделенной на 50 частей. Цена одного деления барабана 0,002 мм. Один оборот бара-

бана соответствует перемещению тубуса на 0,1 мм. Микромеханизм перемещает тубус вместе с механизмом грубой фокусировки. При вращении рукояток грубой и тонкой фокусировки по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки — поднимается.

Предметный столик 11 укреплен на специальном кронштейне, закрепленном на верхней части коробки микромеханизма. С помощью винтов 2, находящихся справа и слева на корпусе кронштейна, столик перемещается (центрируется) на 8 мм, что позволяет подвести нужный участок препарата в поле зрения. На поверхности столика расположено семь отверстий. Четыре крайних отверстия служат для установки пружинных клемм 8, прижимающих препарат, а три средних отверстия — для крепления накладного препаратопроводителя.

Дугообразный тубусодержатель в нижней своей части имеет рукоятку макровинта 4, служащую для грубой фокусировки микроскопа. Верхняя часть тубусодержателя имеет снизу головку 19 для крепления револьвера, а сверху специальное посадочное гнездо для крепления сменных тубусов — наклонного для визуальных исследований и прямого — для фотографических работ. Револьвер 14 имеет гнезда с резьбой для крепления объективов. Вращением револьвера осуществляется смена объективов 18. Конденсатор 16 крепится в гильзе винтом 7, расположенным сбоку кольца кронштейна. Под кронштейном конденсора в коробке микромеханизма укреплена вращающаяся вилка для зеркала.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительной и наблюдательной систем.

Осветительная система находится под предметным столиком. Она состоит из зеркала 21 и конденсора 16 с ирисовой апертурной диафрагмой 22.

Наблюдательная система состоит из объективов 17, призмы 23 и окуляра 18, соединенных в тубусе микроскопа 13.

Объективы составляют самую важную, наиболее ценную и хрупкую часть микроскопа. Они представляют собой систему взаимно центрированных линз, заключенных в металлическую оправу. На верхнем конце оправы имеется резьба, при помощи которой объектив крепится

в гнезде револьвера. Самая маленькая, передняя (ближайшая к объекту) линза в объективе называется фронтальной. Это единственная в объективе линза, производящая увеличение. Все остальные линзы объектива называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения. Каждый объектив характеризуется собственным увеличением, ограничением, разрешающей способностью и некоторыми другими константами.

Все объективы разделяются на сухие и иммерсионные, или погружные. Сухим называется такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. При этом ввиду разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. Объективы сухой системы имеют обычно большое фокусное расстояние и дают малое ($\times 8$) или среднее ($\times 40$) увеличение.

Иммерсионными, или погружными, называют такие объективы, между фронтальной линзой которых и препаратом помещается жидкая среда с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. В качестве иммерсионной среды используют обычно кедровое масло. Можно использовать также воду, глицерин, прозрачные масла, монобромнафталин и др. При этом между фронтальной линзой объектива и препаратом устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата — масло — стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, создавая условия наилучшего освещения препарата (рис. 3). Величина (n) показателя преломления равна для воды 1,33, для кедрового масла 1,515, для монобромнафталина 1,6.

Окуляры Гюйгенса наиболее распространены среди других оптических систем. Они состоят из двух плосковыпуклых линз, вмонтированных в металлическую оправу. Окуляр по своему назначению можно сравнить с лупой. Он строит мнимое изображение и увеличивает его, не выявляя подробностей рассматриваемого объекта. Детали строения препарата раскрывает объектив, давая увеличенное, действительное изображение предмета. Окуляр же только увеличивает эти де-

тали. Благодаря объективу и окуляру получают изображение предмета в микроскопе дважды увеличенное, мнимое, обратное по отношению к препарату.

Собственное увеличение окуляра выгравировано на оправе глазной линзы.

Общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива $V_{об}$ на увеличение окуляра $V_{ок}$:
 $V = V_{об} \times V_{ок}$.

Если объектив дает увеличение $\times 90$, а окуляр $\times 15$, то общее увеличение равно 1350. Для более полного

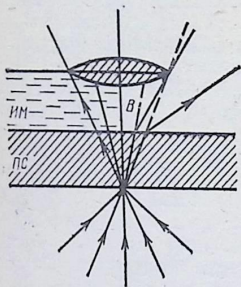


Рис. 3. Ход лучей в иммерсионной и сухой системах:

ИМ — иммерсионное масло ($n=1,515$), В — воздух ($n=1$), ПС — предметное стекло ($n=1,52$)

использования разрешающей способности микроскопа и наилучшего просмотра структуры препарата необходимо использовать оптимальные сочетания объектива и окуляра, дающих так называемое полезное увеличение. Установлено, что полезное увеличение микроскопа не может превышать числовую апертуру объектива более чем в 1000 раз. Допустим, что имеется объектив с увеличением $\times 90$ и апертурой 1,25. Полезное увеличение составит $1000 \times 1,25 = 1250$ раз.

Исходя из полезного увеличения, подбирают оптимально подходящий данному объективу окуляр. Разделив найденную величину полезного увеличения на увеличение использованного объектива, находят величину максимального увеличения окуляра, нужного для работы. Так, $1250:90 \approx \times 14$, или даже лучше с окуляром $\times 10$. Использование более сильного окуляра, например $\times 20$, не даст ожидаемого результата.

Большое увеличение окуляра не выявляет новых деталей на изображении. В результате несоответствия угла зрения в окуляре углу зрения в объективе появится дифракция света, освещенность изображения станет меньше, а детали структуры препарата окажутся расплывчатыми.

Основные правила работы при микроскопии в светлом поле зрения

Микроскоп — сложный оптический прибор. В нерабочем положении микроскоп хранится в футляре или под специальным колпаком. Рабочее положение микроскопа на столе регулируется в соответствии с высотой стола, стула, положением корпуса и рук исследователя. Для успешной работы с микроскопом очень важное значение имеет не только «подгонка» объектива и окуляра. Почти в той же степени важны и обязательны: 1) юстировка оптических осей конденсора и осветителя относительно осей объектива и окуляра; 2) фокусировка конденсора микроскопа и коллектора осветителя; 3) регулировка раскрытия ирисовых диафрагм. Если юстировка проведена неточно, сводятся на нет преимущества самых совершенных приборов. В микробиологических исследованиях гораздо удобнее пользоваться для освещения искусственным источником света. Он отличается от дневного постоянством и большей яркостью и дает возможность регулировки степени освещенности препарата, что очень важно при работе с иммерсионными объективами. В качестве источника света лучше всего использовать осветители ОИ-7, ОИ-9М, ОИ-18, ОИ-19, снабженные низковольтной лампочкой, коллекторной линзой и полевой ирисовой диафрагмой (рис. 4).

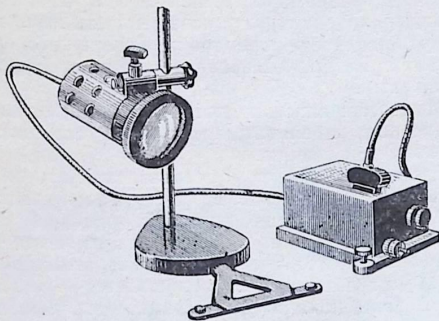


Рис. 4. Осветитель ОИ-9М

Для установки правильного освещения пучком параллельных лучей осветитель устанавливают перед микроскопом на расстоянии 25—30 см и включают в сеть. Зеркало микроскопа, установленное под углом 45° к источнику света, закрывают кружком белой бумаги. Открывают диафрагму коллектора осветителя и направляют пучок света на плоское зеркало микроскопа, покрытое бумагой. Перемещая патрон с лампочкой вдоль оси осветителя, добиваются четкого изображения накаливаемой спирали лампочки на бумаге. Изображение нити накала спирали должно занимать весь диаметр зеркала и совпадать с его горизонтальной плоскостью. Бумагу с зеркала удаляют.

Фокусируют микроскоп при малом увеличении на предметное стекло, помещенное на столике, при открытых диафрагмах осветителя и конденсора. Удаляют предметное стекло, вынимают окуляр и, глядя в тубус на заднюю линзу объектива, постепенно закрывают диафрагму конденсора до тех пор, пока она не начнет ограничивать видимый освещенный диск. При помощи центрирующих винтов сдвигают конденсор до тех пор, пока проекция диафрагмы не совпадет с границами задней линзы объектива. Опускают конденсор до появления нити лампочки в задней линзе объектива. Для повышения контрастности изображения диафрагму можно открывать до $\frac{2}{3}$ выходного зрачка объектива. Окуляр помещают в тубус. Поле зрения микроскопа должно быть равномерно освещено. Вращением зеркальца еще раз центрируют освещенность поля зрения. Степень освещенности препарата регулируется реостатом трансформатора осветителя или нейтральными светофильтрами.

Наладив освещение, помещают на предметный столик микроскопа препарат, закрепляют его зажимами и приступают к изучению.

Исследование всякого объекта следует начинать с объектива сухой системы, дающего малое увеличение. При этом в поле зрения попадает большой участок препарата, что позволяет выбрать для изучения наиболее интересное место. Апертурная диафрагма при работе со слабыми объективами закрывается почти полностью, а степень накала нити лампочки уменьшается трансформатором. Фокусировка объектива ведется одним макрометрическим винтом.

При работе с иммерсионной системой поднимают конденсор, на препарат наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку, опускают макровинтом объектив в масло ниже положения своего точного фокуса. Затем, наблюдая в окуляр, медленно поднимают тубус микроскопа макровинтом до появления в поле зрения сфокусированного изображения препарата. После этого переносят руку на микрометрический винт и, вращая его на $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{4}$ полного оборота, добиваются наибольшей резкости и ясности изображения. Необходимо следить за тем, чтобы препарат был расположен на предметном стекле со стороны объектива. Апертурная диафрагма раскрывается на величину апертуры объектива, конденсор должен быть приподнят, а нить лампочки осветителя должна давать максимум света.

Микроскопическое изучение препарата надо проводить попеременно то правым, то левым глазом, оставляя свободный глаз открытым. Это предупреждает утомляемость в работе и излишнее напряжение зрения. Микроскоп является оптическим прибором и дает коррекцию зрения в диапазоне ± 10 диоптрий. Поэтому лицам, страдающим недостатком зрения, за исключением случаев астигматизма и других существенных дефектов, лучше работать без очков.

Важным условием при микроскопических наблюдениях является выбор предметных и покровных стекол. Толщина предметных стекол не должна превышать 1,2 мм, а покровных — 0,17 мм. Стекла, имеющие большую толщину, ухудшают резкость изображения и мало пригодны для точных микроскопических исследований.

После работы с иммерсионным объективом поднимают тубус, снимают препарат, отводят объектив поворотом револьвера в сторону и удаляют с него иммерсионное масло фильтровальной бумагой или мягкой фланелевой тряпочкой.

Микроскопия в темном поле зрения

Микроскопия в темном поле зрения относится к ультрамикроскопическим методам, так как обладает большей разрешающей способностью (до 0,06—0,02 мкм) и позволяет обнаруживать детали ультраструктуры в препарате, не видимые в микроскоп со светлым полем. Так, большая часть протоплазмы жи-

вых бактерий в светлом поле кажется гомогенной, а при наблюдении в микроскопе с темным полем в ней хорошо заметны различные включения.

Темнопольная микроскопия отличается от обычной тем, что препарат освещается только очень косыми высокоапертурными боковыми лучами. Это достигается применением специальных параболоид-конденсора, конденсора темного поля ОИ-13 (рис. 5) или обычного

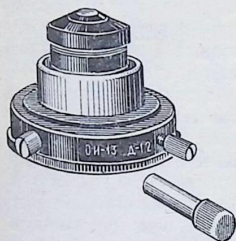


Рис. 5. Конденсор темного поля ОИ-13

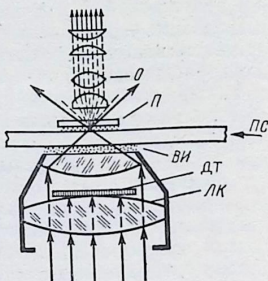


Рис. 6. Ход лучей в темном поле зрения:

О — объектив, П — препарат, ВИ — водная иммерсия, ЛК — линза конденсора, ДТ — диафрагма темного поля, ПС — предметное стекло

конденсора Аббе с затемненной центральной частью. В таких конденсорах задерживается центральная часть параллельного пучка лучей и не попадает в объектив (рис. 6). Поле зрения препарата остается неосвещенным, темным.

Если в препарате содержатся частицы различной оптической плотности, то косые лучи, отраженные конденсором, встречаются с этими частицами, например с микробными клетками, преломляются в них, образуя волны дифрагированного света. Эти дифрагированные лучи распространяются под углами в различных направлениях и часть их попадает в объектив. В результате на темном фоне видны ярко светящиеся частички, например тела бактерий, находящиеся в препарате (рис. 7). Яркость свечения микробных клеток и других

объектов зависит от мощности источника света и точной юстировки системы.

Техника микроскопии. Устанавливают и центрируют освещение по светлomu полю. Заменяют конденсор Аббе со светлым полем на темнопольный конденсор. Для той же цели можно переделать обычный конденсор Аббе. Для этого необходимо отвинтить верхнюю линзу конденсора, положить на центральную часть нижней линзы кружок из черной бумаги (закрывать примерно $\frac{2}{3}$ линзы), привинтить верхнюю линзу. Ставят конденсор в держатель и закрепляют винтом. Открывают полностью диафрагму осветителя, обеспечивая максимальную силу света выключением реостата. На верхнюю линзу спущенного конденсора наносят каплю иммерсионной жидкости (кедровое масло, смесь вазелинового масла и бромнафталина, дистиллированной воды, что проще и доступнее). Жидкость не должна содержать пузырьков воздуха. Для исследования в темном поле препарат готовят по методу раздавленной капли. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло. Каплю накрывают тонким (не более 0,17 мм) покровным стеклом так, чтобы под ним не оказалось пузырьков воздуха. Толщина предметного стекла должна быть не более 1,1 мм, так как в противном случае фокус конденсора (точка пересечения высокоапертурных лучей) будет находиться в толще стекла, а не в плоскости препарата и исследователь не получит эффекта темного поля.

Помещают препарат на предметный столик микроскопа. Приподнимают конденсор до тех пор, пока иммерсионная жидкость распространится по нижней поверхности предметного стекла. Револьвером устанавливают малое увеличение и фокусируют микроскоп на препарат. При правильной центровке конденсора

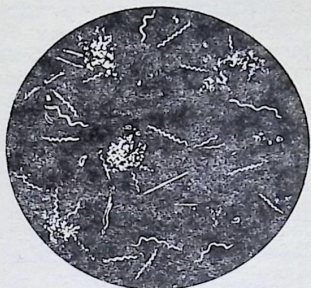


Рис. 7. Бактерии из зубного налета в темном поле зрения

к оптической оси объектива в поле зрения должно быть светлое пятно или светлое пятно с темным центром и светящиеся подвижные точки бактерий или других частичек, содержащихся в препарате. Регулировочным винтом конденсора центрируют светлое пятно на середину поля зрения, а интенсивность его видимости регулируют подъемом или опусканием конденсора. После этого револьвером устанавливают объектив с нужным увеличением (обычно $\times 40$), дополнительно центрируют конденсор и зеркало.

Микроскопия в темном поле зрения применяется для наблюдения за подвижностью микробов, обнаружения возбудителей некоторых болезней (лептоспир) и изучения таких микробов, величина которых находится на грани разрешающей способности светлопольной микроскопии. В темном поле зрения можно изучить влияние различных воздействий на клетку, наблюдать за изменением степени дисперсности коллоидов протопласта и их коагуляцией. В неповрежденной живой клетке протоплазма бывает гомогенной. В результате гибели или повреждения клетки ее содержимое начинает ярко светиться. Однако в темном поле зрения нельзя хорошо изучить форму и тем более внутреннее строение микробов.

Фазово-контрастная микроскопия

Известно, что контрастность изображения находится в прямой зависимости от степени поглощения света различными структурными элементами объекта. Если в объекте чередуются места, сильно и слабо адсорбирующие свет, то последний, проходя через объект, изменяет свою амплитуду. Интенсивность световых лучей, прошедших через различные участки такого объекта, будет различной. Такие препараты называются амплитудными.

Наряду с амплитудными существуют совершенно прозрачные объекты. Пройдя через такие объекты, свет или совсем не ослабляется, или ослабляется чрезвычайно мало. Однако в зависимости от различных показателей преломления отдельными участками объекта или его неравномерной толщины по выходе из объекта смещается фаза светового колебания. Сдвиг фазы происходит из-за неодинаковой скорости распространения

света в средах с различной оптической плотностью. В местах большей оптической плотности свет как бы замедляет свою скорость, изменяется по фазе. Такие объекты называются фазовыми. К ним относится большинство живых клеток и микроорганизмов. Глаз человека и фотопластинка фазовые колебания света не выявляют. Для их обнаружения служит метод фазовых контрастов, предложенный в 1934 г. голландцем Цернике.

Метод фазовых контрастов основан на использовании теории Аббе о дифракционном построении изображения в микроскопе (рис. 8).

Сущность метода сводится к тому, что обычный конденсор микроскопа заменяют на специальный конденсор с кольцевой диафрагмой, а в револьвер ввинчивают специальный объектив. На полевую линзу этого объектива нанесена фазовая пластинка в виде кольца, состоящая из тонкого слоя специального состава. Кольцо света, проходя через кольцевую диафрагму конденсора и объект, фокусируется на фазовой пластинке объектива. Фазовая пластинка значительно ослабляет силу света нулевого максимума и смещает фазы проходящих через него прямых световых волн на 90° , т. е. на $\frac{1}{4}$ длины волны.

Луч света, падающий на прозрачный объект, расщепляется на два луча — прямой и дифрагированный. Прямой луч (рис. 8, А) идет из кольцевой диафрагмы, проходит через частицу объекта и фокусируется на кольцо фазовой пластинки. Дифрагированный луч,

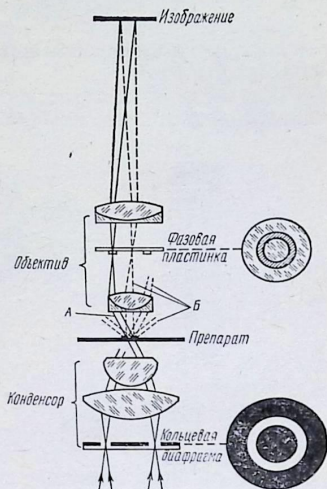


Рис. 8. Ход лучей в фазово-контрастном микроскопе:

А — прямой и Б — дифрагированный лучи

(рис. 8, Б), проходя через объект, не попадает на фазовую пластинку. Оптические пути этих двух лучей оказываются различными. Между ними создается разность фаз, и невооруженным глазом нельзя уловить это смещение фаз. Однако фазовой пластинкой эти фазовые изменения преобразуются в амплитудные, воспринимаемые глазом изменения. Прозрачные в светлом поле зрения препараты становятся резко контрастными на светлом фоне (положительный фазовый контраст) или блестящими на темном фоне (отрицательный фазовый контраст).

Для фазово-контрастной микроскопии используют специальное приспособление КФ-4 (рис. 9).

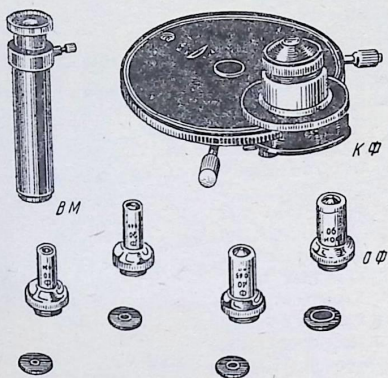


Рис. 9. Приспособление для фазово-контрастной микроскопии:

ВМ — вспомогательный микроскоп, КФ — конденсор фазовый, ОФ — объективы фазовые

Настройку микроскопа с фазово-контрастной приставкой производят следующим образом:

1. Заменяют объективы и обычный конденсор в микроскопе на фазовые.
2. Поворотом диска конденсора устанавливают нулевую диафрагму (в окошечке должна появиться цифра 0).

3. Помещают препарат на столик микроскопа, при объективе $\times 10$ устанавливают освещение и производят фокусировку. Диафрагму конденсора открывают полностью.

4. Заменяют нулевую диафрагму конденсора на диафрагму, соответствующую увеличению используемого фазового объектива. Так, при рассматривании препарата с объективом $\times 10$ повернуть револьвер конденсора до появления в окошечке цифры 10.

5. Заменяют окуляр микроскопа на вспомогательный микроскоп. Ослабив винт, осторожно поднимают выдвижную трубу вспомогательного микроскопа до появления отчетливого изображения кольцевой диафрагмы конденсора и фазовой пластинки объектива.

6. Фиксируют выдвижную трубу вспомогательного микроскопа винтом.

7. Вращением центрировочных винтов конденсора совмещают кольцевую диафрагму конденсора с фазовым кольцом объектива.

8. Вынимают вспомогательный микроскоп из трубы, вставляют нужный окуляр, устанавливают фокус и изучают объект.

9. При каждой смене объективов необходимо повторить все операции, указанные в пунктах 4, 5, 6, 7, 8.

Фазово-контрастная микроскопия не увеличивает разрешающей способности оптической системы микроскопа. Однако она позволяет видеть тонкие детали структуры живых микробов, изучить стадии их развития и процесс деления, выявить влияние химических веществ, антибиотиков и других факторов на микробную клетку, измерить ее прижизненную величину.

Люминесцентная микроскопия

Применение люминесцентной микроскопии основано на свойстве некоторых веществ светиться (флуоресцировать) при облучении их невидимыми для человеческого глаза коротковолновыми лучами (фиолетовыми, ультрафиолетовыми, рентгеновскими и др.). Изображение в люминесцентном микроскопе возникает не в результате прохождения света через препарат, а из-за свечения (флуоресценции) самого препарата, возбуждаемого коротковолновой частью спектра. При флуоресценции молекулы вещества, на которые падают ультрафиоле-

товые лучи, трансформируют их и испускают лучи с другой, обычно большей, длиной волны. Люминесценция сопровождается изменением цвета вещества, видимого при обычном свете. Различают первичную и вторичную люминесценцию. Под первичной люминесценцией понимают явления свечения тел, естественно содержащих в себе флуоресцирующие вещества. Первичным свечением обладают клетки растений и водорослей благодаря наличию хлорофилла, некоторые бактерии, вырабатывающие пигмент, а также некоторые минералы.

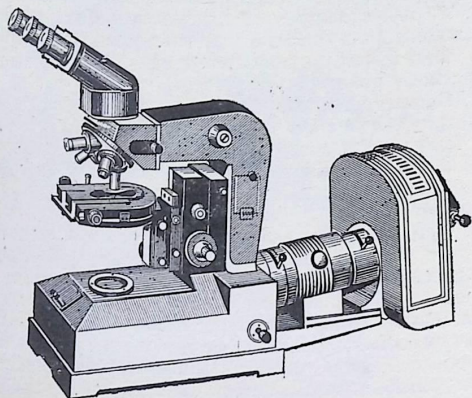


Рис. 10. Люминесцентный микроскоп МЛ-2

Вторичная (или наведенная) люминесценция тел, не обладающих собственной люминесценцией, достигается обработкой их специальными красками, называемыми флуорохромами. Эти краски связываются с белками микробной клетки и сообщают им характерную флуоресценцию.

Люминесцентная микроскопия осуществляется в затемненной комнате с помощью специального люминесцентного микроскопа, например МЛ-2 (рис. 10), или с помощью специальной приставки к обычному микро-

скопу, состоящей из опак-иллюминатора ОИ-17 и осветителя ОИ-18.

Характер люминесценции различен у разных видов микробов. Отдельные компоненты микробных клеток одного и того же вида неодинаково связывают и адсорбируют флуорохромы, следствием чего является различие в цвете и яркости свечения. Так, акридин оранжевый при низких концентрациях и определенном рН связывается с ДНК в виде зеленых мономеров, а с РНК — в виде красных димерных структур, дающих различное свечение в ультрафиолетовом свете.

Люминесцентная микроскопия позволяет наблюдать объекты, которые при обычной микроскопии лежат за пределами видимости. Кроме того, она дает возможность дифференциации вида микроба по характеру свечения, позволяет изучить изменения структур при различных функциональных состояниях клетки. Перспективным является применение меченых люминесцирующими красками иммунных сывороток для изучения антигенной структуры бактерий и обнаружения возбудителей заразных болезней в исследуемом материале и в тканях.

Электронная микроскопия

Электронная микроскопия как метод исследования в биологии, физике, химии, минералогии и других научных отраслях находит все большее применение. В электронных микроскопах изображение объекта на специальном флуоресцирующем экране получается с помощью потока электронов, а не луча света, как в световом микроскопе.

В зависимости от назначения и способов наблюдения объектов электронные микроскопы делятся на просвечивающие, отражательные, эмиссионные, растровые, теневые и зеркальные. В биологических исследованиях чаще всего применяется электронный микроскоп просвечивающего типа.

Разрешающая способность современных электронных микроскопов достигает 1—0,5 нм, а увеличение — в 500—600 тыс. раз.

Главные элементы конструкции современного электронного микроскопа показаны на рис. 11.

Конструкция электронного микроскопа и схема по-

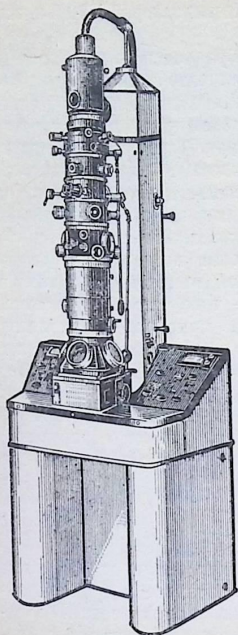


Рис. 11. Электронный микроскоп УЭМБ-100

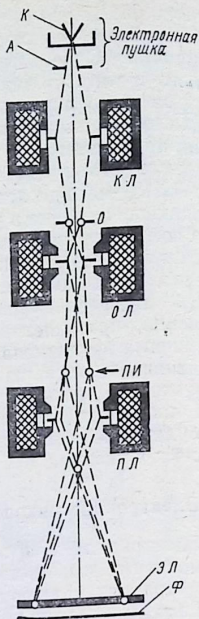


Рис. 12. Поток электронов в электронном микроскопе:

К — катод, А — анод, КЛ — конденсорная линза, О — объектив, ОЛ — объективная линза, ПИ — первичное изображение, ПЛ — проекционная линза, ЭЛ — экран люминесцирующий, Ф — фотопластика

строения изображения объектов пучком проходящих электронов являются своеобразными копиями обычного светового микроскопа (рис. 12).

Техника подготовки препаратов для электронной микроскопии резко отличается от той, которая используется при светооптической микроскопии. Культуры микроорганизмов, ультратонкие срезы и другие объек-

ты и ткани для просмотра в электронном микроскопе должны готовиться на очень тонкой (10—15 нм), про- ницаемой для электронов подложке. В качестве под- ложки чаще всего применяют тонкую пленку, которую изготавливают из коллодия, формвара, угля или квар- ца. В связи с тем что пленки бывают очень тонкими и непрочными, их помещают на специальные металли- ческие (обычно медные) сетки или бленды с мелкими ячейками.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп, освети- тель, иммерсионное масло, штатив с пробирками, бактериологиче- ская петля, пастеровские пипетки, пинцет, скальпель, вата, сосуд с дезинфицирующим раствором, лоток с мостиком для окраски препаратов, набор красок, предметные и покровные стекла, мыло, спички, салфетки хлопчатобумажные, фильтровальная бумага, бу- мажка для установки освещения микроскопа, готовые окрашенные препараты (мазки) с разными формами бактерий.

Задание 1. Ознакомиться с помещениями учебной микробиологической лаборатории и оснащением рабо- чего места, с охраной труда и техникой безопасности.

2. Изучить устройство микроскопа, правила пользо- вания им в микробиологической практике при работе с иммерсионным объективом.

3. Установить правильное освещение микроскопа.

4. Просмотреть готовые окрашенные мазки с по- мощью сухого и иммерсионного объективов. Микрокар- тину зарисовать.

Методические указания. Студентов знакомят с ус- тойством бактериологической лаборатории кафедры со всеми ее подразделениями: лабораторной комнаты с боксами, автоклавной, средоварки, моечной, вегета- ционного домика и др.

В учебной аудитории за студентами закрепляют ра- бочие места, знакомят с оборудованием рабочих мест и назначением отдельных приборов и материалов. Ознакомление с устройством микроскопа проводится показом отдельных его частей и демонстрацией техни- ки работы с микроскопом при микробиологических исследованиях. Обращается особое внимание на уста- новку правильного освещения в микроскопе.

Каждый студент отрабатывает технику микроскопии

бактериальных препаратов в следующей последовательности:

устанавливает микроскоп в наиболее удобном для работы положении на своем рабочем месте и налаживает освещение;

помещает на предметный столик микроскопа готовый окрашенный мазок, закрепляет его зажимами;

просматривает препарат с помощью сухого объектива и отыскивает лучшее место для детального исследования;

поднимает тубус микроскопа и с помощью револьвера устанавливает иммерсионный объектив;

наносит палочкой каплю кедрового масла на препарат;

погружает в кедровое масло фронтальную линзу иммерсионного объектива, наблюдая сбоку за тем, чтобы не раздавить объективом предметное стекло и не повредить линзы объектива;

глядя в окуляр, медленно поднимает тубус микрометрическим винтом до появления в поле зрения микроскопа изучаемого объекта;

уточняет фокус микрометрическим винтом и изучает полученный препарат;

зарисовывает микроскопическую картину в альбом;

поднимает тубус, убирает рассматриваемый препарат, удаляет фильтровальной бумажкой и салфеткой кедровое масло с объектива, выключает осветитель;

закрывает микроскоп чехлом, приводит в порядок рабочее место.

Глава II

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ

Морфология бактерий

Бактерии — это мельчайшие, преимущественно одноклеточные организмы растительной природы, не содержащие хлорофилла. За свои биологические особенности и способность размножаться путем простого поперечного деления они получили название грибов-дрожжевок и относятся к классу *Schizomycetes* порядку *Eubacteriales*.

Величина бактерий колеблется от десятых долей микрометра ($1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$) до 10—15 мкм в длину и от 0,2 до 1,0 мкм в диаметре. Имеются, однако, организмы значительно меньших и больших размеров. Размеры и форма бактерий могут значительно изменяться под влиянием условий существования (температура, осмотическое давление, антибиотики и др.), оставаясь, однако, постоянными при относительно стабильных условиях, свойственных данному виду, роду или семейству, приобретенных в процессе длительной эволюции.

Бактериальная клетка — это живой организм с чрезвычайно сложной внутренней организацией, включающей ряд морфологически и биохимически обособленных структур, каждая из которых выполняет определенную жизненную функцию.

Внешние морфологические признаки бактериальных клеток — форма, величина, взаимное расположение и сочетание клеток — используются при классификации бактерий.

По форме бактерии подразделяются на три основные группы: 1) шаровидные (кокки), 2) палочковидные (бактерии, бациллы, клостридии), 3) извитые (вибрионы, спириллы и спирохеты).

Кокки — *Coccus* — имеют, как правило, шаровидную форму с диаметром в 1—2 мкм (рис. 13). Реже встречаются кокки бобовидной, ланцетовидной, сферической и других форм. Для различных кокков характерно свое-

образное расположение клеток, зависящее от направления их деления. Характер расположения кокков в культуре — основа классификации их на роды. Если кокки делятся только в одной плоскости и дочерние клетки быстро расходятся, то образуются моно- или микрококки (род *Micrococcus*). При делении в одной плоскости дочерние клетки могут оставаться скрепленными

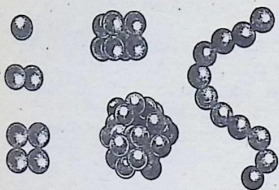


Рис. 13. Расположение кокков

попарно — диплококки (род *Diplococcus*) или образовывать цепочки, состоящие из нескольких соединенных клеток, — стрептококки (род *Streptococcus*).

При делении в двух взаимно перпендикулярных плоскостях образуются кокки, соединенные по 4 клетки, — тетракокки (род *Tetracos-*

cus). В случае деления клетки в трех взаимно перпендикулярных направлениях расположение кокков напоминает форму пакетов или тюков, состоящих из 8, 16 и более клеток. Это так называемые сарцины (род *Sarcina*).

Многие кокки делятся беспорядочно, образуя кучки, похожие на гроздья винограда. Это стафилококки (род *Staphylococcus*). Среди представителей этой группы встречаются микроорганизмы, патогенные для человека и животных.

Палочковидные, или цилиндрические, микроорганизмы имеют чаще всего цилиндрическую форму с резко обрезанными, заостренными или закругленными концами (рис. 14). Палочковидные формы, не образующие спор, называются бактериями (род *Bacterium*). Некоторые представители палочковидных бактерий имеют разветвленную форму — коринебактерии (род *Corinebacterium*). Величина палочковидных бактерий сильно варьирует. Имеются бактерии, стоящие на грани видности в оптическом микроскопе ($0,1 \times 0,15$ мкм), и настоящие гиганты в несколько десятков микрон, например некоторые серобактерии. Размеры большинства палочковидных бактерий находятся в пределах 1—5 мкм в длину и 0,5—1 мкм в диаметре. Среди палоч-

ковидных форм имеются организмы, в протоплазме которых при условиях, неблагоприятных для развития вегетативных форм, образуется овальной или круглой формы тельце — спора.

Такие спорообразующие микроорганизмы называются бациллами (род *Bacillus*) или клостридиями

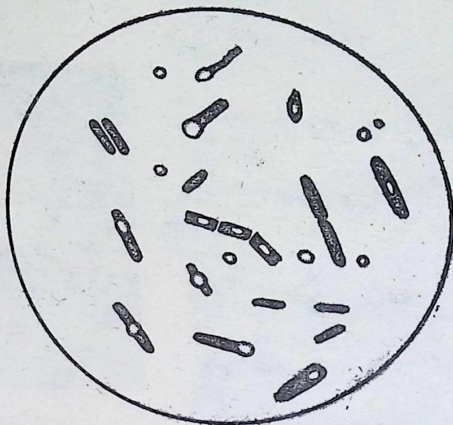


Рис. 14. Бактерии и бациллы с различным расположением спор

(род *Clostridium*). Расположение палочковидных форм микробов может быть беспорядочное, парное (диплобактерии, диплобациллы) или по несколько палочек в цепочку (стрептобактерии, стрептобациллы.). Среди этой самой многочисленной и разнообразной группы микроорганизмов встречаются как сапрофитовые — безвредные, так и патогенные — болезнетворные виды.

Извитые бактерии имеют один или несколько завитков (рис. 15). Бактерия, имеющая один неполный завиток спирали в виде запятой, называется вибрионом (род *Vibrio*, рис. 16). Если бактерия имеет несколько спиралевидных завитков, то ее называют спириллой (род *Spirillum*), а микробов, имеющих штопорообразно извитую форму с большим количеством мелких завитков,

называют спирохетами (порядок *Spirochaetales*). Морфологию и внутреннюю структуру бактерий можно изучать на препаратах живых и неживых культур.

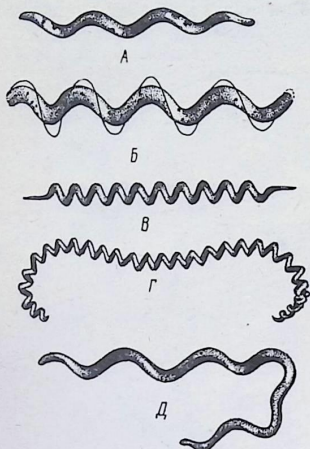


Рис. 15. Спириллы и спирохеты:
А — спирохета; Б — кристиспира;
В — трепонема; Г — лептоспира;
Д — боррелия

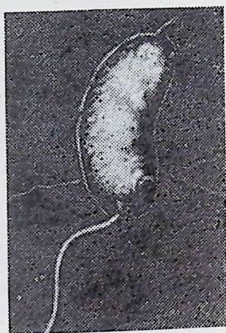


Рис. 16. Вибрион

Строение бактериальной клетки

Клетка «идеальной» бактерии (рис. 17) состоит из коллоидной цитоплазмы, содержащей различные структуры: ядерный аппарат (ДНК), вакуоли, мезосомы, рибосомы, а также структурные элементы, сходные с митохондриями. Однако истинных митохондрий у бактерий пока не обнаружено. Цитоплазма составляет основную массу живого вещества бактериальной клетки.

Цитоплазма бактерий представляет собой коллоидную систему, состоящую из воды, белков, жиров, углеводов и минеральных веществ. В молодых клетках цитоплазма оптически однородна, с возрастом в ней

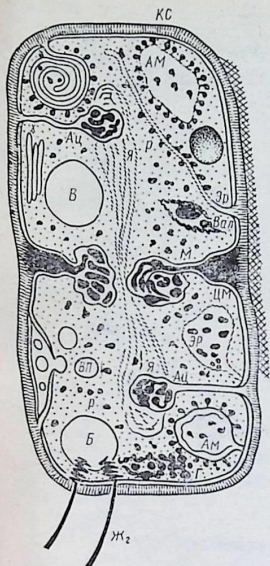


Рис. 17. Схема строения клетки «идеальной» бактерии (по В. И. Бирюзовой):

Я — нуклеоид, М — мезосома, АМ — аналоги митохондрий, КС — клеточная стенка, К — капсула, ЦМ — цитоплазматическая мембрана, АЦ — аналоги centrosom, В — вакуоль, ВП — выделительные пузырьки, Б — блефаробласт, Ж — жгутики, Ж₂ — жир, Вол — волютин, Г — гликоген, Р — рибосомы, Эр — эндоплазматический ретикулум, Х — хромосомы



Рис. 18. Ультраструктура *Bac. subtilis*. Электронная микрофотография. $\times 190\,000$ (Эйзерлинг и Роминг, 1962):

1 — ядерная субстанция с фибриллами, 2 — рибосомы, 3 — клеточная стенка, 4 — двухслойная цитоплазматическая мембрана, 5 — мезосома, 6 — перегородка

появляются вакуоли и зернистость. В цитоплазме бактерий могут быть различные включения и отложения в виде капелек жира и серы, гранул метафосфатов, гликогена, волютина, кристаллов оксалатов и скоплений пигмента. Гликоген и гранулеза являются запасными питательными веществами, относящимися к полиса-

харидам. Они часто обнаруживаются в клетках маслянокислых и пектинолизующих бацилл. Липопroteinные включения встречаются в клетках *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides* и у некоторых видов спирилл и грибов.

Волютин относится к азотистым соединениям. В его составе содержится большое количество полифосфатов и РНК. Зерна волютина окрашиваются метиленовой синькой в фиолетовый цвет, а цитоплазма клетки — в синий (метахромазия). Волютин содержат молочно-кислые и уксуснокислые бактерии, азотобактер и *Spirillum volutans*. Кристаллы оксалатов представляют собой конечные продукты окисления питательных веществ.

Кроме того, в цитоплазме бактерий находятся органоиды, принимающие участие в обмене веществ. На электронных микрофотографиях они имеют вид мелких гранул — рибосом (рис. 18). В них содержится большое количество рибонуклеиновой кислоты и белка. В них происходит синтез белков. Кроме рибосом в протоплазме содержатся мезосомы — особые органеллы, образующиеся в результате выпячивания и инвагинации цитоплазматической мембраны. В мезосоме и цитоплазматической мембране локализуются окислительно-восстановительные ферменты бактерий, подобно тому как в митохондриях высших организмов сосредоточены ферменты, связанные с окислением жирных кислот, окислительным фосфорилированием и циклом Кребса.

Ядро (нуклеоид, или нуклеоплазма) у бактерий неправильной формы (рис. 19) с фибриллярной структурой, представляет собой двухцепочечную молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В отличие от животных и растительных клеток нуклеоид у прокариотических клеток не окружен ядерной мембраной и имеет вид округлого зернистого или волокнистого образования. ДНК у бактерий, как правило, не связана с основными белками и имеет палочковидную, сферическую или кольцевидную форму. Вся наследственная информация, определяющая свойства прокариотической клетки, заключена в нуклеоиде в структуре, называемой бактериальной хромосомой. У некоторых видов бактерий дезоксирибонуклеиновая кислота в форме гранул рассеяна в той или иной степени в центральной части цитоплазмы и группируется более компактными массами лишь при определенных стадиях клеточ-

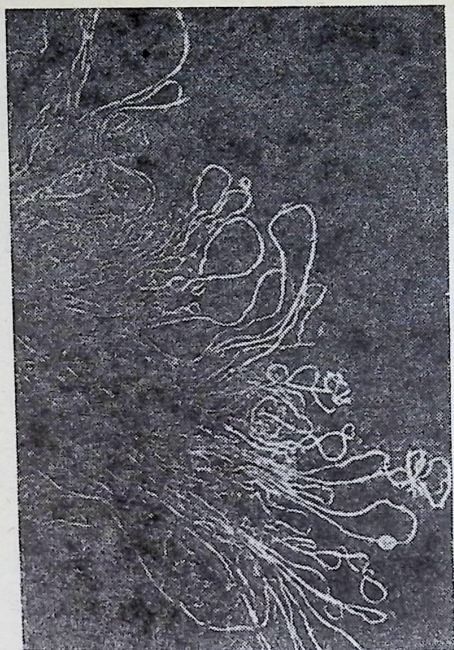


Рис. 19. Электронная микрофотография ДНК
Microb. lysodeikticus (по В. Браун)

ного деления. В одной вегетативной клетке может быть не одно, а несколько ядерных образований. Причиной многоядерности клеток является, по-видимому, отсутствие синхронизации между скоростью роста клетки и скоростью клеточного деления. Скорость деления ядра пропорциональна скорости роста, следовательно, в молодых, активно растущих культурах преобладают многоядерные клетки, потому что ядерное вещество может успеть разделиться несколько раз до наступления деления клетки. В старых культурах большинство клеток содержит по одному ядру.

Ядерный аппарат бактерий контролирует обмен веществ и является носителем наследственной информации клеток. Он выполняет функции, присущие хромосомам высших организмов.

Многие бактерии могут содержать в цитоплазме небольшие внехромосомные молекулы ДНК кольцевой формы, способные к автономной репликации. Это так называемые плазмиды. Плазмиды несут детерминанты таких фенотипических свойств, как устойчивость к лекарственным веществам и антибиотикам, а также информацию о ферментах некоторых второстепенных метаболических путей. Плазмиды могут быть утрачены клеткой без ущерба для ее жизнеспособности.

Цитоплазматическая мембрана. Это наружный слой цитоплазмы, тесно связанный с клеточной стенкой. Цитоплазматическая мембрана бактерий богата липопротеидами и РНК. Она является осмотическим барьером с избирательной проницаемостью. В ней локализируются окислительно-восстановительные ферменты, РНК и белки, которые обеспечивают регулируемую роль мембраны в процессах питания и дыхания бактериальной клетки, азотфиксации и хемосинтеза.

Клеточная стенка представляет собой многослойное образование, плотно покрывающее цитоплазматическую мембрану. В клеточной стенке большинства бактерий различают три слоя: наружный — липопротеиновый, средний — липополисахаридный и внутренний — мукопептидный (муреиновый). Этот слой обеспечивает жесткость (жесткость) клеточной стенки. В нем содержатся в значительном количестве мукополипептиды, полифосфатнуклеотиды и липиды. У грамположительных бактерий наиболее выражен именно этот муреиновый слой. У грамотрицательных бактерий этот слой незначителен. Он прикрыт сверху более мощным липополисахаридным и липопротеидным слоями.

Капсула бактерии (рис. 20) представляет собой самый верхний рыхлый слизистый слой, состоящий из полисахаридов, полипептидов или протеинов. Капсула служит средством защиты бактерий от неблагоприятных воздействий окружающей среды: от высыхания, от защитных факторов организма (фагоцитоз, действие антител) и химических веществ.

Иногда капсула образуется вокруг целой группы клеток, соединенных между собой (например, *Azoto-*

bacter chroococcum). Такие группы бактерий, окруженные единой слизистой капсулой, называют зооглеями.

Интенсивное образование капсулы сапрофитными микробами идет при избытке в питательной среде углеводов и недостатке азотистой пищи, а у некоторых видов — при низкой температуре культивирования.

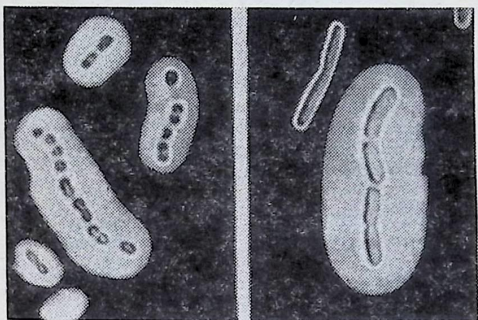


Рис. 20. Капсулы у бактерий. Окраска тушью

Вокруг тела некоторых нитчатых бактерий вследствие затвердения наружных слоев клеточной стенки образуются особые чехлики, или влагалища. У железобактерий в этих чехликах отлагается гидроокись железа, и клетки приобретают при этом особую прочность.

Цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка и капсула, если она имеется у данного вида микроба, образуют клеточную оболочку бактерий.

Жгутики являются органами передвижения некоторых видов бактерий. Они представляют собой очень тонкие (0,01—0,05 мкм), длинные винтообразно скрученные пучки фибрилл, отходящих от базальных гранул, расположенных в цитоплазме (рис. 21). Они состоят из фибриллярного белка флагаина, отличающегося по своим антигенным свойствам от белков протоплазмы. По форме жгутики бывают изогнутые, спиралевидные, волнистые. Жгутики имеются почти у половины палочковидных и извитых форм и у некоторых

видов шаровидных бактерий. Бактерии имеют жгутики преимущественно в молодом возрасте, а с возрастом могут утрачивать их. Механические воздействия (энер-

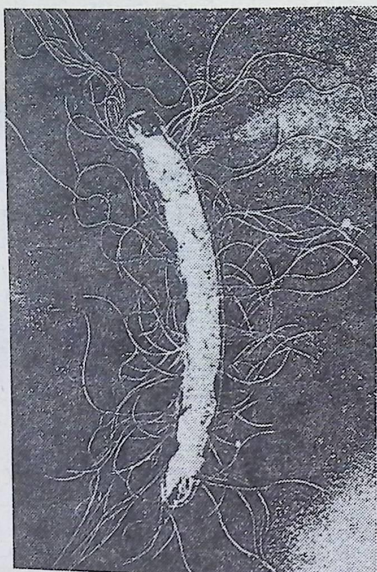


Рис. 21. Электронная микрофотография *Proteus vulgaris*. Хорошо видны жгутики, отходящие от базальных ядер, клеточная стенка с цитоплазматической мембраной и зернистая цитоплазма

гичное встряхивание пробирки с бактериями и др.) обрывают жгутики. Бактерии при этом теряют подвижность, однако это не отражается на их жизнеспособности.

В зависимости от расположения жгутиков все подвижные бактерии делятся на четыре группы (рис. 22): монотрихи — бактерии с одним жгутиком, расположен-

ным на конце (*Vibrio metchnikovii* — вибрион Мечникова); амфотрихи — бактерии, имеющие по одному жгутику или несколько жгутиков на каждом полюсе (*Pseudomonas fluorescens* — флюоресцирующая бактерия); лофотрихи — клетки, имеющие пучок жгутиков, расположенных на одном конце (*Ps. cuniculanea* — бактерия синего молока); перитрихи — бактерии со множеством жгутиков, расположенных по всей поверхности клетки (*Proteus vulgaris* — палочка протей, *E. coli* — кишечная палочка).

Передвижение бактерий обусловлено спиральными или волнообразными движениями жгутиков в результате ритмических сокращений фибрилл, что и определяет характер движения бактерий. Монотрихи всегда движутся по прямой линии, совершая иногда воронкообразные движения

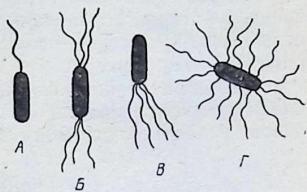


Рис. 22. Расположение жгутиков у бактерий: А — монотрихи; Б — амфотрихи; В — лофотрихи; Г — перитрихи

на одном месте. Движения перитрихов, наоборот, всегда беспорядочные, кувыркательные. Спирохеты движутся без жгутиков — они передвигаются за счет вращательных движений вокруг своей продольной оси, змеевидных сокращений и волнообразных изгибов клетки. Миксобактерии ползают по поверхности плотных сред за счет слизи, выделяемой в окружающую среду.

Реснички (фимбри, пили) — тонкие, короткие (0,2—2 мкм) отростки, расположенные по всей бактериальной клетке. Они способствуют склеиванию бактерий друг с другом или адсорбции их на почвенных частицах, растительных и животных клетках.

Споры бактерий — внутриклеточные образования (эндоспоры) круглой, овальной и даже стручковой формы, сильно преломляющие свет. Спорообразование присуще многим видам палочковидных, особенно почвенных бактерий, некоторым видам шаровидных (*Sarcina urea*, *Enterococcus*) и извитых (*Spirillum amyloferus*, *Vibrio desulfuricans*) форм бактерий. Процесс спорообразования начинается в тех случаях, когда окружаю-

щие условия становятся неблагоприятными для продолжения вегетативного роста, например при истощении питательной среды азотсодержащими или энергетическими веществами (глюкоза, молочная кислота и др.). Споры можно рассматривать как приспособление организма для сохранения вида в неблагоприятных условиях. Однако они не являются ответной реакцией на неблагоприятные условия. Они часто прорастают и развиваются в вегетативные формы в той же самой среде, в которой образовались. Это скорее одна из форм существования вида — стадия покоя. Они не являются органами размножения.

Спорообразование начинается с уплотнения цитоплазмы и концентрации ДНК в центре клетки или на одном из ее концов. Вокруг этого участка цитоплазма

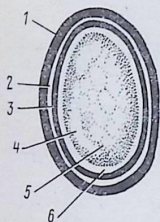


Рис. 23. Строение спор бацилл:

1 — наружная оболочка (экзина), 2 — пластинчатый слой, 3 — внутренняя оболочка (интина), 4 — хроматиновые тельца, 5 — цитоплазма, 6 — споропласт

уплотняется, дифференцируется и превращается в первичную внутреннюю оболочку, называемую интиной. Образуется протоспора. Затем формируется наружный слой оболочки (экзина). Экзина содержит смолистые и липоидные вещества и служит защитным покровом. Она трудно проницаема для воды и растворенных в ней веществ. Протоспора превращается в зрелую спору (рис. 23). Зрелая спора под микроскопом имеет вид плотных блестящих телец. После образования споры вегетативная часть клетки постепенно отмирает и разрушается. Обычно в микробной клетке образуется одна спора. Процесс спорообразования продолжается в течение 1,5—32 ч.

Размер, форма и положение споры в клетке характерны для вида. Однако они зависят от возраста культур, от состава питательной среды, температуры культивирования и других факторов. Споры могут иметь центральное, субтерминальное (приконцевое) и терминальное (на конце) положение в клетке (см. рис. 14). В тех случаях, когда спора занимает в клетке центральное положение, а ее диаметр меньше или равен

диаметру вегетативной клетки, бактерия не меняет формы. Такие спорообразующие бактерии относятся к роду *Bacillus* (*Bac. anthracis*, *Bac. subtilis*). Диаметр споры может быть больше диаметра самой бактерии. В этом случае стенка бактерии растягивается, а форма приобретает вид веретена, сигары, булавы или барабанной палочки, в зависимости от места расположения споры. Такие спорообразующие бактерии относятся к роду *Clostridium* (*Cl. butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. pectinovorum*, *Cl. cellulosaе omelianskii*).

Споры значительно устойчивее вегетативных клеток к действию физических и химических факторов, плохо воспринимают красители. Объясняется это наличием плотных оболочек, непроницаемых для воды и растворенных в ней веществ, небольшой концентрацией свободной воды, высоким содержанием липидов, инактивацией ферментных систем, большим содержанием кальция, магния, калия, фосфора и дипиколиновой кислоты, не содержащейся в вегетативных клетках. Споры выдерживают длительное кипячение (до нескольких часов), погибают при прогревании сухим жаром (165°С) через 2 ч, при автоклавировании (121°С) — через 15 мин. В покоем состоянии споры могут сохраняться во внешней среде (почва, вода, остатки растений и др.) десятки лет, не теряя жизнеспособности.

Попадая в благоприятные условия, споры быстро (за 3—5 ч) прорастают. Спора вначале набухает (вследствие поглощения воды), теряет способность резкого светопреломления, наружная оболочка ее ослизняется, истончается под влиянием наступившей активности внутренних ферментов и разрывается. Интина растягивается и участвует в образовании новой клеточной оболочки. Молодая вегетативная клетка покидает оболочку споры. Оболочки спор в виде пустых чехликов можно обнаружить в питательной среде. В зависимости от места появления проростка различают полярное, экваториальное и косое прорастание спор.

Споры имеют очень плотную, плохо проницаемую для красок оболочку и при обычных методах окраски не прокрашиваются. Они имеют вид светлых округлых включений, лежащих под оболочкой окрашенных бак-

териальных клеток. Для окраски спор препарат обрабатывают сильнодействующими красящими растворами и протравами.

Изучение микробов в окрашенном состоянии

Самым распространенным методом изучения морфологии микробов является микроскопия окрашенных мазков, приготовленных из чистых культур микробов или из исследуемого материала. Для этого вначале готовят мазок, высушивают его, фиксируют, а затем окрашивают. Мазки готовят на совершенно чистых, хорошо обезжиренных предметных стеклах. Обезжиривать стекла можно этиловым спиртом, смесью равных объемов спирта и эфира и другими жидкостями. Самым простым и практически удобным способом обезжиривания стекол является протирание их с обеих сторон кусочком хозяйственного мыла. Мыло удаляют со стекла кусочком сухой ваты или салфеткой.

Приготовление мазка. При изготовлении мазка из колонии бактерий, выращенных на косом агаре, вначале наносят на обезжиренное предметное стекло каплю физиологического раствора стерильной бактериологической петлей. Затем берут в левую руку пробирку с культурой, а в правой держат бактериологическую петлю, как карандаш. Пробирку с культурой удерживают в наклонном положении большим и указательным пальцами так, чтобы хорошо была видна вся скошенная поверхность питательной среды с колониями бактерий (рис. 24). Прокаливают бактериологическую петлю в пламени горелки. Безымянным пальцем и мизинцем правой руки (остальные пальцы правой руки заняты петлей) захватывают и извлекают из пробирки ватно-марлевую пробку, удерживая ее в таком положении во время всех последующих манипуляций. Вынув пробку, стерилизуют край отверстия пробирки над пламенем горелки. Вводят в пробирку через пламя стерильную петлю, охлаждают ее на стенке пробирки и только после этого осторожно прикасаются к колонии бактерий. Захватывают часть колонии (без агара!), петлю извлекают, а пробирку над пламенем закрывают пробкой и ставят в штатив. Петлю с культурой вносят в каплю физиологического раствора на стекле и делают два-три круговых движения. Часть бактерий эмульги-

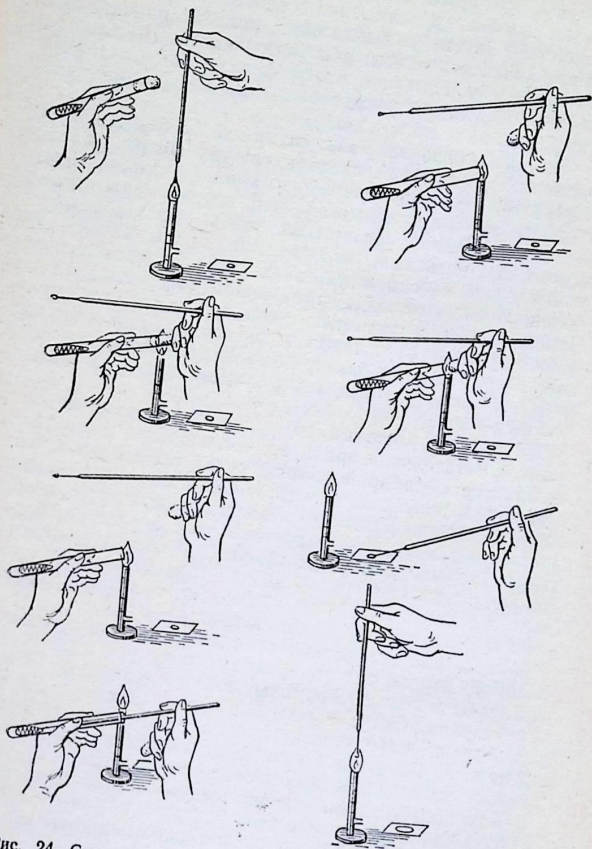


Рис. 24. Схема последовательности работ при изготовлении мазка

руется в жидкости. Избыток бактерий, оставшихся на петле, сжигают в пламени горелки, нагревая петлю докрасна. Затем охлажденной петлей размазывают каплю физиологического раствора с внесенными бактериями по стеклу. Площадь мазка должна быть в диаметре 1,5—2 см. Мазок должен быть тонким с равномерным распределением материала.

При изготовлении мазка из колонии бактерий, выращенных на плотной среде в чашках Петри, вначале наносят на обезжиренное стекло каплю физиологического раствора. Затем около пламени горелки приоткрывают крышку чашки Петри так, чтобы через образовавшуюся щель можно было ввести петлю. Только что прокаленной и охлажденной петлей захватывают небольшую часть колонии, намеченной для исследования. Чашку закрывают, а петлю с культурой вносят в каплю физиологического раствора и делают два-три круговых движения. Избыток бактерий на петле сжигают в пламени, а каплю распределяют тонким слоем по поверхности стекла.

Если мазок готовят из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, то, соблюдая те же правила стерильности, набирают каплю культуры петлей или пипеткой и наносят ее на середину обезжиренного стекла. Пипетку с остатком культуры погружают в сосуд с дезинфицирующим раствором. Пробирку закрывают над пламенем пробкой и ставят в штатив. Каплю равномерно распределяют по стеклу бактериологической петлей. Петлю прожигают в пламени горелки и ставят в штатив или в стакан.

Мазок высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха, держа его за продольные ребра высоко над пламенем горелки. Границы мазка очерчивают восковым карандашом с обратной стороны стекла, а со стороны мазка на одном из концов стекла ставят номер препарата. По этим отметкам легко можно ориентироваться в месте расположения мазка на стекле.

Для приготовления мазка следует наносить на стекло небольшое количество культуры, так как в густом мазке микробы лежат плотным слоем и невозможно изучить их морфологию.

Высушенный мазок фиксируют. Фиксация преследует следующие цели: 1) убить микробы, чтобы сделать препарат безопасным для дальнейшей работы; 2) закрепить

микробы на стекле, чтобы их не смыли при окраске и промывке водой; 3) улучшить восприимчивость красок.

Способов фиксации мазков много. Можно фиксировать их в этиловом и метиловом спирте, ацетоне, спирт-эфире и других жидкостях и смесях. Наиболее простым, пригодным почти для всех микробиологических объектов и самым распространенным в практике методом является фиксация в пламени горелки. Для этого предметное стекло берут пинцетом или большим и указательным пальцами за продольные ребра мазком кверху и проводят его 3—4 раза через наиболее горячую верхнюю часть пламени горелки. Надежность фиксации проверяется температурой стекла. Если с прикосновением стекла к тыльной стороне ладони ощущается легкое жжение, то считают, что мазок зафиксирован надежно. Необходимо помнить, что при излишнем перегревании или при фиксации влажного препарата мазок портится: наступает денатурация и свертывание белка, нарушается структура и морфология бактерий. При недостаточной фиксации микробы не убиваются, не приклеиваются к стеклу и при дальнейшей обработке смываются.

Окрашивание мазка. Механизм окраски микробов рассматривают в настоящее время как сложный физико-химический процесс взаимодействия красителя с содержимым бактериальной клетки.

Различают простые и сложные, или дифференциальные, методы окраски.

Простая окраска заключается в нанесении на препарат какой-либо одной анилиновой краски. Чаще всего для этих целей употребляется или фуксин Пфейффера — красная краска, или щелочной раствор метиленового синего (синька Леффлера) — голубая краска.

Техника окраски: хорошо зафиксированный препарат помещают мазком вверх на стеклянный мостик над ванночкой. На поверхность мазка пипеткой или из капельницы наносят одну из указанных красок. Количество краски должно быть умеренным и покрывать весь мазок, но не стекать за пределы стекла. Фуксин выдерживают на мазке 1—2 мин, а синьку — 3—5 мин. Краску с мазка сливают, препарат промывают водой, высушивают на воздухе или осторожно промокают

фильтровальной бумагой. На высушенный мазок наносят каплю иммерсионного масла, помещают препарат на предметный столик микроскопа и наблюдают через иммерсионный объектив ($\times 90$) в проходящем свете.

Простой окраской пользуются для обнаружения в исследуемом материале микробов, определения их количества, формы и расположения.

Дифференциальные способы окраски бактерий. Сложные методы окраски имеют большое значение при определении и дифференциации различных видов микробов. Они основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки и применяются для детального изучения структуры клетки и выявления отличительных признаков по отношению к некоторым красителям. При этих методах мазок окрашивают несколькими красками и дополнительно обрабатывают протравами или обесцвечивающими веществами — спиртом, кислотой и др. К этим методам относят окраску по Граму, Цилю — Нильсену, Нейссеру и др.

Окраска по Граму. Все бактерии по своему отношению к этому методу окраски разделяются на две группы: 1) красящиеся по Граму — грамположительные (грамположительные) и 2) не красящиеся по Граму — грамотрицательные (грамнегативные). Отношение к окраске по Граму — важный дифференциальный признак бактерий, он упоминается при их характеристике и систематике.

Сущность этого метода состоит в том, что краски трифенилметанового ряда, например генцианвиолет, метилвиолет, кристаллвиолет, при соединении с иодом в присутствии магниево-соли рибонуклеиновой кислоты, мукополисахаридов и полифосфатнуклеотидов, содержащихся в наружном слое протоплазмы и ригидном слое клеточной стенки некоторых бактерий, образуют комплекс, плохо растворимый в спирте. Такие бактерии после обработки спиртом остаются окрашенными в сине-фиолетовый цвет. Это грамположительные бактерии (G^+), воспринимающие генцианвиолет. К ним относятся большинство шаровидных бактерий и многие виды палочковидных, например *Bacillus subtilis*, *Clostridium pasteurianum* и др.

У некоторых бактерий мукополисахаридный и полифосфатнуклеотидный комплексы содержатся в очень ма-

лых количествах и прикрыты сверху двумя оболочками, состоящими из липопротеидов и липополисахаридов. Генцианвиолет и иод медленно диффундируют через эти слои к ригидному мукополинуклеотидному слою и не образуют с ним прочного соединения. Такой несвязавшийся с мукополисахаридами и полифосфатнуклеотидами комплекс генцианвиолет — иод легко растворяется спиртом и выводится из клетки. Бактерии обесцвечиваются. При дополнительной окраске они воспринимают цвет той краски, которой производят докрашивание (например, розовый при окраске фуксином). Такие бактерии (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* и др.) называются грамотрицательными (Г—).

Техника окраски. На фиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, заранее пропитанной генцианвиолетом. На бумагу наносят 3—5 капель водопроводной воды. Через 1—2 мин бумажку удаляют пинцетом, а на препарат наливают раствор Люголя. (Раствор Люголя состоит из 2 г иодистого калия и 1 г иода кристаллического, растворенных в 300 мл дистиллированной воды.) Через 30 с — 1 мин сливают раствор Люголя. Наносят несколько капель 96% спирта. Обесцвечивают $\frac{1}{2}$ —1 мин до исчезновения серовато-фиолетовых струек. Препарат промывают водой. На мазок наливают фуксин Пфейффера и выдерживают 1—2 мин. Краску сливают, препарат промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют иммерсионной системой. Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетово-синий (например, палочка маслянокислого брожения — *Cl. pasteurianum*), а грамотрицательные — в розово-красный цвет (кишечная палочка — *E. coli*).

Окраска кислотоустойчивых бактерий. Некоторые виды бактерий плохо воспринимают краски при окраске обычными методами. Это связано с тем, что в цитоплазме таких бактерий (например, *Mycobacterium tuberculosis*) содержится миколовая кислота, вступающая в тесную химическую связь с карболфуксином при окраске. Кроме того, оболочка таких бактерий имеет сложное трехслойное строение. В ее составе содержится большое количество липоидов и воскоподобных веществ, препятствующих проникновению обесцвечивающих кислот внутрь клеток. Такие бактерии резистентны к минеральным кислотам (серной, соляной) и называются

кислотоустойчивыми (актиномицеты, коринебактерии и ряд сапрофитных бактерий, встречающихся в молоке, в масле и содержимом кишечника, а также некоторые патогенные микроорганизмы — возбудители туберкулеза и др.).

В основе способов окраски кислотоустойчивых бактерий лежит принцип применения факторов, усиливающих реактивность веществ, находящихся в теле микроба. К таким взаимодействиям относятся увеличение концентрации краски, применение специальных протрав и высокой температуры.

Техника окраски по Цилю — Нильсену. Готовый мазок высушивают на воздухе и фиксируют в пламени горелки; затем мазок покрывают полоской фильтровальной бумаги, заранее пропитанной карболовым фулкином Циля. На бумагу капают 3—5 капель воды; мазок берут пинцетом и подогревают над пламенем горелки до появления пара. Отводят мазок в сторону для охлаждения и, если нужно, добавляют 2—3 капли воды. Снова подогревают препарат (2—3 раза), охлаждают, бумагу удаляют, мазок промывают водой; обесцвечивают препарат 5%-ным раствором серной кислоты, погружая его 2—3 раза в сосуд с кислотой, или наливают раствор на мазок на 3—5 с и тщательно промывают мазок водой; наносят на мазок водно-спиртовой раствор метиленового синего на 3—5 мин. Промывают препарат водой, высушивают и исследуют.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в рубиново-красный цвет, все остальные — в синий.

Окраска волютина по Нейссеру. Это сложный метод окраски, в котором используются несколько красок и дифференцирующих смесей. Для окраски по Нейссеру необходимо приготовить следующие растворы красителей.

Раствор уксуснокислого синего
Нейссера:

метиленовый синий	0,1 г
спирт 96%-ный	2,0 мл
ледяная уксусная кислота	5,0 мл
дистиллированная вода	100,0 мл

Раствор везувина:

везувин	2,0 г
спирт 96%-ный	60,0 мл
дистиллированная вода	40,0 мл

Смесь кипятят и по охлаждении фильтруют.

Раствор хризондина (используется вместо везувина)

хризондин 1,0 г
горячая дистиллированная вода 300,0 мл

Техника окраски. На приготовленный фиксированный мазок наливают уксуснокислый синий Нейссера и выдерживают 1—2 мин. Краситель сливают и препарат промывают водой. На мазок наливают раствор Люголя и выдерживают 20—30 с. Не промывая водой, препарат окрашивают в течение 2—3 мин раствором везувина или хризондина, затем промывают водой, высушивают и исследуют.

Тела бактерий окрашиваются в светло-коричневый цвет, зерна волютина — в темно-синий.

Окраска жира. Для обнаружения жира лучше всего пользоваться такими красками, которые растворяются в жире. Например, суданом III, суданом черным.

Окраска суданом черным.

Готовят два раствора красок:

1. Судан черный В 0,3 г
этиловый спирт 70%-ный . 100 мл
2. Сафранин 1,5 г
дистиллированная вода . 50 мл

Сафранин растворяют в кипящей воде и по охлаждении фильтруют.

Техника окраски. Готовят мазок из молодой (18—24 ч) культуры, фиксируют его в пламени горелки. Наливают на мазок спиртовой раствор судана черного и выдерживают при комнатной температуре 10—15 мин. Препарат промывают водой и наносят на мазок раствор сафранина, выдерживают 5 мин. Промывают препарат водой, высушивают и исследуют под иммерсией.

В результате протоплазма клеток окрашивается в розовый, капли жира — в черный цвет.

Окраска капсул. Обнаружение капсул у микробов может иметь иногда дифференциально-диагностическое значение.

Окраска по Бури. На обезжиренное стекло наносят каплю туши, разведенной водой 1:10. В тушь

вносят каплю исследуемой культуры. Жидкость хорошо перемешивают и равномерно распределяют по стеклу петлей или шлифованным стеклом. Мазок высушивают на воздухе и, не фиксируя, микроскопируют с иммерсией.

Фон препарата темно-дымчатый, тела и капсулы бактерий бесцветные.

Окраска по Антони (в модификации Тейлора).

Готовят два раствора:

1. Кристаллвиолет	0,1 г
ледяная уксусная кислота	0,25 мл
дистиллированная вода	100 мл
2. Медный купорос	20 г
дистиллированная вода	100 мл

Техника окраски. Готовят мазок и высушивают его на воздухе. Наносят на мазок уксуснокислый кристаллвиолет и выдерживают 5—7 мин. Промывают препарат раствором медного купороса, высушивают, микроскопируют иммерсионной системой.

Результаты: клетки бактерий темно-синие, капсулы — сине-лиловые.

Окраска жгутиков. Это одна из наиболее трудных процедур в бактериоскопической технике, так как жгутики очень легко повреждаются при изготовлении препаратов.

При изготовлении окрашенных препаратов для обнаружения жгутиков следует строго соблюдать следующие условия: 1) все стекла, употребляемые для приготовления мазков, должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными в смеси спирт—эфир; 2) культура бактерий должна находиться в стадии наибольшей подвижности (в возрасте 12—18 ч); 3) эмульсия бактерий должна готовиться заранее без механического повреждения жгутиков.

Для обнаружения жгутиков бактерии лучше выращивать на свежем скошенном агаре, содержащем конденсационную воду. Для приготовления эмульсии бактерии берут петлей с агара у конденсационной воды, т. е. там, где больше влаги. Петлю с культурой осторожно (соблюдая стерильность) переносят в пробирку с 2 мл стерильной водопроводной воды. Осторожным погружением петли в воду смывают с нее бактерии. Петлю

извлекают, пробирку закрывают пробкой и помещают в термостат на 30 мин.

Обезжиренное сухое предметное стекло проводят несколько раз через пламя горелки. Пастеровской пипеткой берут эмульсию микробов из пробирки и наносят несколько капель на конец охлажденного стекла. Конец стекла немного приподнимают и дают каплям медленно стечь к центру. Мазок высушивают при комнатной температуре и не фиксируют. Окраску мазков производят одним из следующих методов.

Окраска по методу Грея:

Реактивы

1. Протрава:

насыщенный водный раствор калийных квасцов	5 мл
танин (20%-ный водный раствор) . .	2 мл
насыщенный раствор сулемы	2 мл

2. Краситель (карболовый фуксин Циля):

раствор А — основной фуксин (90% содержания краски)	0,3 г
этиловый спирт (96%-ный)	10,0 мл
раствор Б — фенол	5 г
дистиллированная вода	95 мл

При длительном хранении к протраве добавляют несколько капель хлороформа. Перед употреблением смесь фильтруют.

Растворы А и Б смешивают. Перед употреблением фильтруют.

Техника окраски. На приготовленный (не фиксированный) мазок наливают свежеотфильтрованную протраву и выдерживают 10 мин. Промывают препарат дистиллированной водой. Наливают на мазок свежеотфильтрованный карболовый фуксин Циля, выдерживают 5 мин. Промывают водопроводной водой, высушивают на воздухе и исследуют иммерсионной системой.

В результате жгутики окрашиваются в красный цвет.

Серебрение по Морозову:

Приготавливают три реактива:

1. Фиксатор:

ледяная уксусная кислота	1 мл
формалин промышленный (40%-ный)	2 мл
дистиллированная вода	97 мл

2. Протрава:

танин :	5,0 г
карболовая кислота (жидкая)	1 мл
дистиллированная вода	100 мл

3. Раствор азотнокислого серебра

Раствор азотнокислого серебра готовят следующим образом: 1 г кристаллического азотнокислого серебра растворяют в 20 мл дистиллированной воды. К раствору по каплям прибавляют 25%-ный раствор аммиака до исчезновения образовавшегося темно-коричневого или буро-черного осадка и появления легкой опалесценции раствора. Для окрашивания исходный раствор разводят 1:10 дистиллированной водой.

Техника окраски. Бактериальную эмульсию смешивают 1:1 с раствором формалина в пробирке и выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение 2 ч. Готовят мазок, высушивают его на воздухе или в термостате. Наливают на мазок свежееотфильтрованную протраву и выдерживают 6—7 мин. Можно подогреть препарат на легком пламени до отхождения паров. Мазок промывают дистиллированной водой и наливают на препарат раствор азотнокислого серебра. Препарат слегка подогревают над пламенем горелки до отхождения паров и образования темно-коричневого фона. Промывают водой, высушивают на воздухе, исследуют иммерсионной системой. В результате утолщенные протравой и азотнокислым серебром жгутики имеют желто-коричневый цвет, фон — светло-желтый.

Окраска спор (способ Ожешки). Препарат готовят обычным методом, но не фиксируют. На высушенный нефиксированный мазок наливают 0,5%-ный раствор соляной кислоты и подогревают 2 мин (до появления паров). Препарат охлаждают, отмывают водой, высушивают и фиксируют на пламени горелки. На мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги и наливают несколько капель карболового фуксина Циля. Подогревают препарат над пламенем до появления пара.

Охлаждают препарат, бумагу с фуксином удаляют. Мазок промывают водой и обесцвечивают препарат в течение нескольких секунд 5%-ным раствором серной кислоты, споласкивают водой. Дополнительно окрашивают препарат метиленовым синим в течение 3—5 мин. Препарат промывают водой, высушивают и исследуют под иммерсией. Споры оказываются окрашенными в яркий рубиново-красный цвет, а вегетативные тела бактерий — в синий или лиловый.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Полное оборудование рабочего места. Пробирки со смесью стафилококка, антраконда и кишечной палочки в физиологическом растворе. Чашки Петри с ростом колоний кишечной палочки, пробирки с ростом чистых культур *Azotobacter chroococcum*, *Bac. anthracoides*, готовые окрашенные мазки *Cl. pectinovorum*, *Cl. pasteurianum* и бактерий со жгутиками (*Proteus vulgaris*). Набор красок для окраски волютина (по Нейссеру) и спор (по Ожешке).

Задание. 1. Приготовить мазки: а) из смеси стафилококка, антраконда и кишечной палочки; окрасить по Граму; б) из колоний кишечной палочки; окрасить синькой или фуксином.

2. Изучить морфологию и тинкториальные (отношение к окраске) свойства шаровидных, палочковидных и извитых форм микробов в приготовленных препаратах.

3. Приготовить мазок из чистой культуры *Az. chroococcum*, окрасить его (по Нейссеру).

4. Приготовить мазок из чистой культуры *Bac. anthracoides*, окрасить его (по Ожешке).

5. Просмотреть готовые мазки из культур клостридий с терминальным (*Cl. pectinovorum*) и субтерминальным (*Cl. pasteurianum*) расположением спор.

6. Микроскопическую картину зарисовать в альбоме.

Методические указания. Ознакомление студентов с морфологией основных форм бактерий проводится путем изучения приготовленных и окрашенных мазков из смеси палочковидных и шаровидных микробов и из чистых культур, выращенных на плотных средах в чашках Петри.

Каждый студент обезжиривает мылом 3—4 предметных стекла и на них готовит мазки.

Приготовленные мазки высушивают на воздухе, фиксируют на пламени горелки и окрашивают смесь по Граму, а из чистых культур — синькой или фуксином. Устанавливают освещение микроскопа, наносят на мазки каплю иммерсионного масла, помещают их на столик микроскопа и исследуют иммерсионной системой.

Ознакомление студентов со строением бактериальной клетки и ее органоидами проводится путем изучения приготовленных ими и готовых окрашенных препаратов. Лучше всего удается студентам окраска зерен волютина и спор у бацилл. Для этого каждый студент обезжиривает мылом 2—3 предметных стекла и готовит на них мазки из чистых культур микроорганизмов. Зерна волютина лучше изучать на *Corynebacterium diphteroides*, но можно для этого использовать и *Az. chroococcum*, уксуснокислые и молочнокислые бактерии.

При ознакомлении студентов со спорообразующими микробами целесообразно показать им культуры с центральным, субтерминальным расположением спор. В целях экономии времени студенты готовят мазок только из одной какой-либо культуры, например из *Bac. anthracoides*, а культуры других микроорганизмов получают в виде готовых окрашенных препаратов.

Окраска жгутиков у бактерий требует определенных навыков и затрат большого количества времени. Поэтому целесообразнее всего показать готовые окрашенные препараты жгутиковых бактерий путем демонстрации.

При просмотре под микроскопом обращают внимание на форму микробов, строение концов клеток, их взаимное расположение, отношение к окраске, наличие спор и других включений в протоплазме. Наблюдаемая картина микроструктуры бактерий зарисовывается в альбомах.

Исследование микроорганизмов в живом состоянии

Для определения формы и наблюдения за подвижностью микробов, их размножением, спорообразованием и прорастанием спор пользуются бактериоскопическими препаратами, приготовленными из живых микробов. Прижизненное исследование микроорганизмов прово-

дится в «раздавленной» и «висячей» капле, в микрокамерах с плотными средами, в темном поле зрения, фазовом контрасте и в негативных препаратах.

Раздавленная капля. На середину чистого предметного стекла петлей или пипеткой наносят каплю исследуемого материала (взвесь микробов в физиологическом растворе, бульонная культура). Если препарат готовят из культуры, выращенной на плотной питательной среде (что крайне нежелательно, так как подвижность может утрачиваться), то на предметное стекло вначале наносят каплю физиологического раствора, в которую вносят петлей культуру микробов. Каплю покрывают сверху покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха, мешающих исследованию. Удачно сделанная капля должна заполнять все пространство между предметным и покровным стеклами, но не выходить за края последнего. Исследование проводят объективами сухой системы наибольшего увеличения ($\times 40$ — $\times 60$), в затемненном поле зрения — при суженной диафрагме и опущенном конденсоре.

Активно движущиеся бактерии проплывают через поле зрения, обгоняют друг друга, меняют направления, совершают вращательные и круговые движения. Пассивное, броуновское движение отличается от активного тем, что совершаются беспорядочные колебательные движения микробов около одних и тех же точек.

Висячая капля. В висячей капле рассматривают суспензию живых микробов в жидкой питательной среде или в физиологическом растворе. Суспензия микробов не должна быть густой.

Для приготовления висячей капли используют специальные предметные стекла с углублением — с «луночкой» в центре и обычное покровное стекло. Край луночки предметного стекла слегка смазывают вазелином. Небольшую каплю исследуемого материала наносят петлей на середину покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и опускают на покровное стекло таким образом, чтобы находящаяся на нем капелька суспензии приходилась на центр луночки.

Предметное стекло слегка прижимают к покровному, и стекла склеиваются. Препарат приподнимают

и быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметическая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно приготовленном препарате капля должна свободно свисать с покровного стекла и не соприкасаться с дном или краями лунки. Под малым увеличением микроскопа в затемненном поле зрения при суженной диафрагме и опущенном конденсоре отыскивают край капли и передвигают ее в центр поля зрения. Стекло фиксируют зажимами, а каплю исследуют сильным объективом сухой системы.

Раздавленную и висячую каплю применяют главным образом для определения подвижности микроорганизмов, а также для изучения строения грибов, дрожжей и некоторых простейших.

Недостатком методов является то, что бактерии свободно перемещаются в жидкой среде, чем исключается возможность наблюдения за отдельными особями. Кроме того, в раздавленной капле жидкость быстро испаряется, препарат высыхает и становится непригодным для исследования.

Микрокамеры с плотными средами. Одним из лучших типов камеры с использованием плотной среды является Ш-образная камера Пешкова. Для приготовления камеры на тонкое предметное стекло (0,5 мм) наливают слой расплавленного прозрачного мясо-пептонного агара толщиной не более 0,2 мм. После того как среда застынет, стерильным скальпелем вырезают из нее две небольшие полоски. Оставшуюся в центре полоску среды засевают исследуемой культурой. Засеянную камеру немедленно прикрывают стерильным тонким покровным стеклом. Среду, выступавшую за пределы покровного стекла, удаляют. Края препарата для создания герметичности заливают расплавленным парафином. В результате получается герметическая Ш-образная камера, средняя полоска которой, засеянная культурой, граничит с двух сторон с воздушными канавками. Воздух из канавок диффундирует в питательную среду, обеспечивая нормальное развитие аэробных бактерий.

Герметичность и оптическая гомогенность камеры создают хорошие условия для длительного микроскопического изучения мельчайших изменений клеточных структур при делении бактерий.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп с осветителем, диски из черной бумаги, фазово-контрастное приспособление, предметные и покровные стекла, стекла с лупочкой, бактериологическая петля, капельница с дистиллированной водой, пробирка с физиологическим раствором, смесь подвижных и неподвижных бактерий.

Задание. 1. Приготовить висячую каплю и изучить препарат из культур бактерий в светлом поле зрения.

2. Приготовить «раздавленную» каплю из подвижных микробов и изучить препарат: а) в темном поле зрения; б) в фазовом контрасте (демонстрация).

3. Микроскопическую картину зарисовать в альбом.

Методические указания. Каждый студент готовит висячую каплю из смеси бактерий и просматривает препараты под микроскопом при затемненном поле зрения сухой системой. Висячую каплю начинают просматривать под малым увеличением ($\times 8$). Находят край капли, выступающий в виде темной округлой полосы на матовом фоне препарата. Переводят край капли в центр поля зрения и револьвером заменяют объектив малого увеличения на объектив среднего увеличения ($\times 40$). Макрометрическим винтом устанавливают фокус, поддерживают его микрометрическим винтом и наблюдают за характером движений бактерий в препарате.

Устанавливают в микроскопе конденсор темного поля или вставляют между линзами обычного конденсора диск из черной бумаги. Устанавливают конденсор на место и наносят на его верхнюю линзу каплю дистиллированной воды. Готовят раздавленную каплю и помещают препарат на столик микроскопа. Налаживают темное поле (см. с. 22), просматривают препарат.

Преподаватель устанавливает препарат в микроскопе с фазово-контрастным приспособлением и демонстрирует его студентам.

Морфология спирохет

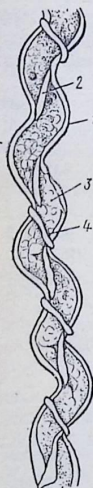
Спирохеты относятся к порядку Spirochaetales. Они имеют форму тонких, штопорообразно изогнутых клеток, достигающих 200 мкм и более в длину, при толщине 0,3—1,5 мкм. Тело спирохет состоит из центрально расположенной эластичной многофибриллярной осевой

нити, покрытой с поверхности длинной винтообразно накрученной лентой цитоплазмы. С поверхности спирохеты покрыты трехслойной оболочкой (рис. 25). Однако типичной для бактерий оболочки с ригидной стенкой у них нет. Спор и капсул не образуют, дифференцированного ядра нет.

Размножаются спирохеты поперечным делением. Они обладают активным поступательным движением и передвигаются за счет вращательных движений вокруг своей продольной оси, волнообразных сокращений цитоплазмы и фибрилл осевой нити. Некоторые представители имеют длинные тонкие жгутики, расположенные по концам клетки. По своим свойствам эта группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между истинными бактериями и простейшими.

Порядок *Spirochaetales* представлен двумя семействами: спирохеты (*Spirochaetaceae*) и трепонемы (*Treponemataceae*).

Семейство *Spirochaetaceae* включает три рода — *Spirochaeta*, *Cristispira* и *Saprospira*. Это — сапрофиты, обитающие в почве, стоячих водоемах и сточных водах. Клетки их очень длинные (200—500 мкм) и тонкие (0,3—1,0 мкм), содержат большое количество жира и зерен метакроматина.



Семейство *Treponemataceae* включает три рода: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*. Среди представителей этих родов спирохет имеются возбудители ряда опасных инфекционных заболеваний людей и животных, например сифилиса — *Treponema pallida*, возвратного тифа — *Borrelia recurrentis*, лептоспироза — *Leptospira icterohaemorrhagiae* и др.

Роль спирохет в минерализации органических веществ и почвообразовательном процессе до сих пор полностью не изучена.

Рис. 25. Ультраструктура лептоспиры:

1 — наружная стенка, 2 — осевая нить, 3 — цитоплазматическая спираль, 4 — поперечные кольца

Морфология актиномицетов

Актиномицеты — одноклеточные микроорганизмы, входящие в класс *Schizomycetes*, порядок *Actinomycetales*. Они составляют как бы переходную группу микроорганизмов между истинными бактериями и грибами. Тело большинства актиномицетов состоит из одной клетки, вытянутой в тонкую (0,2—1 мкм), длинную (до нескольких миллиметров), ветвящуюся нить, называемую гифой. Скопления нескольких гиф образуют колонию, напоминающую мицелий грибов. Клетка актиномицетов состоит из нежной оболочки, построенной по типу бактериальной, гомогенной цитоплазмы, содержащей иногда капельки жира, включения хроматина и других веществ. Дифференцированного ядра у актиномицетов нет. Все это сближает их с истинными бактериями. При старении культур гифы некоторых актиномицетов распадаются на палочковидные или кокковидные формы, также напоминающие строение бактерий.

Актиномицеты размножаются вегетативным путем — поперечным делением клетки, а также поперечным разделением гифы на отдельные сегменты или образованием овальных фрагментов под ее оболочкой. Представители этих актиномицетов спор не образуют (сем. *Mycobacteriaceae* и *Actinomycetaceae*). Многие виды актиномицетов размножаются конидиеспорами (сем. *Streptomycetaceae*) и спорангиоспорами (сем. *Actinoplanaceae*), образующимися на конидиефорах или в спорангиях, отходящих от воздушного мицелия (рис. 26). Большинство актиномицетов — сапрофиты. Они встречаются в почве, навозе, воде, на растениях, на коже и в ротовой полости людей и животных (*Mycob. phlei.*, *Mycob. smegmatis*, *Actinomyces albus* и др.). В качестве пластического материала и источников энергии они способны использовать такие сложные вещества, как белок, жиры, углеводы и углеводороды (нефть, парафин), клетчатку, крахмал, резину, карболовую кислоту, крезолы и др.

В порядке *Actinomycetales* встречаются виды, патогенные для людей, животных и растений, а также виды, активно продуцирующие антибиотики (стрептомицин, тетрациклин и др.), витамины группы В, никотиновую кислоту и т. д.

Актиномицеты в больших количествах содержатся в почве, навозе и других гниющих веществах. Они играют большую роль в образовании гумуса почвы, придают почве специфический запах.



Рис. 26. Расположение конидиеносцев у стрептомицетов

Морфология грибов

К грибам (Fungi, Mycetes) относятся широко распространенные в природе бесхлорофилльные растительные организмы, отличающиеся от бактерий более сложным строением и более совершенными способами размножения. Вегетативное тело большинства грибов состоит из тонких ветвящихся нитей, называемых ги-

фами. Сплетения гиф образуют мицелий, или грибницу. У низших грибов мицелий одноклеточный (несептированный), но многоядерный, у высших — многоклеточный (септированный), состоящий из ряда разделенных перегородками одноядерных клеток. Мицелиальные клетки грибов имеют оболочку, протоплазму, дифференцированное ядро и ядрышки. Кроме того, протоплазма грибов богата вакуолями и различными включениями (зерна волютина, капельки жира и гликогена). В поперечных перегородках многоклеточного мицелия имеются небольшие отверстия.

В некоторых случаях отдельные участки мицелия тесно переплетаются и образуют так называемые склероции — покоящиеся стадии мицелия или строма — ложную ткань, которая служит опорой для плодовых тел. Скопления конидиеносцев образуют коремии. На мицелии могут развиваться различные органы: ризоиды (подобие корней у растений), служащие для поглощения питательных веществ, гаустории, аппрессории и другие приспособления (присоски), с помощью которых грибы прикрепляются к субстрату. У хищных грибов на мицелии образуются специальные петли, кольца и другие приспособления для улавливания мелких нематод, простейших и личинок насекомых. Размножаются грибы вегетативным, бесполом и половым путем. Вегетативное размножение может происходить участками мицелия, каждая часть которого способна дать начало новой колонии гриба.

Бесполое размножение происходит путем почкования, фрагментации или с помощью спорообразования. При почковании на материнской клетке образуется одна или две небольшие выпуклости — почки. В почку из материнской клетки переходит одно ядро, затем почка увеличивается в размере и отшнуровывается. Такой тип размножения характерен для дрожжей. При фрагментации происходит распад гиф на отдельные фрагменты или сегменты, называемые оидиями, артроспорами и хламидоспорами. Наиболее широко распространенным способом размножения у грибов является бесполое спорообразование. У низших грибов споры образуются внутри специальных плодовых тел — в спорангиях, располагающихся на спорангиеносцах гифов мицелия. Такие споры называются эндоспорами, или спорангиоспорами. Типичный представитель

этой группы грибов — головчатая плесень (*Mucor racemosus*). У высших грибов бесполое размножение осуществляется экзогенными спорами — конидиями. Конидии отчленяются от стеригм, расположенных на концах специализированных плодоносящих гиф мицелия, называемых конидиеносцами.

Половое размножение у большинства грибов, так же как и у других организмов, осуществляется путем слияния двух ядер половых или, реже, вегетативных клеток. Половой процесс у грибов происходит в форме изогамии, гетерогамии, зигогамии, оогамии и др. У более примитивных грибов в результате полового процесса формируются покоящиеся зигоспоры или ооспоры. У более организованных грибов возникают специальные половые эндогенные аскоспоры (у сумчатых грибов) или экзогенные базидиоспоры (у базидиальных).

Способы размножения грибов, особенности строения органов бесполого размножения и вегетативного мицелия лежат в основе классификации грибов. В настоящее время грибы подразделяются на несколько классов, некоторые из них имеют определенное практическое значение.

Класс хитридиевые (Chytridiomycetes) — наиболее примитивные грибы. У некоторых видов имеется слабо-развитый очень тонкий, в большинстве случаев безъядерный мицелий (ризомицелий), отходящий от центрально расположенной округлой одноядерной или многоядерной клетки, покрытой оболочкой. Вегетативное тело других представителей этого класса представлено комочком голой цитоплазмы, лишенной оболочки. Подавляющее большинство представителей этого класса — внутриклеточные паразиты высших растений, водорослей и животных. Так, *Olpidium brassicae* паразитирует на капустной рассаде, вызывая заболевание, известное под названием черная ножка, а *Synchytrium endobioticum* Перс. — рак клубней картофеля. Размножаются хитридиевые грибы бесполым способом — путем образования одножгутиковых подвижных зооспор и половым путем, который неодинаков у различных видов.

Класс оомицеты (Oomycetes) включает в себя три порядка: Saprolegniales, Leptomitales, Peronosporales. Представители этого класса имеют хорошо развитый неклеточный мицелий. Бесполое размножение происходит при помощи зооспор, снабженных двумя жгутиками.

ми. Большинство видов этого класса грибов живет в воде, однако известно большое количество видов порядка *Peronosporales*, перешедших к наземному образу жизни. Среди них имеются весьма вредоносные представители, вызывающие опаснейшие заболевания высших растений: возбудитель фитофтороза картофеля — *Phytophthora infestans*, возбудитель ложной мучнистой росы винограда — *Plasmopara viticola*, пероноспороза табака — *Peronospora tabacina* Ad. и др.

Класс зигомицеты (*Zygomycetes*). Представители этого класса обычно имеют хорошо развитый, обильно ветвящийся у большинства видов одноклеточный мицелий с большим количеством гаплоидных ядер. Размножаются зигомицеты половым способом с образованием подвижных зигоспор и бесполом — путем образования спорангиоспор. Имеются среди этого класса паразитические виды. Типичные представители класса — роды *Mucor*, *Rhizopus*, *Pilobolus* и др.

Род мукор (*Mucor*) — головчатая плесень имеет хорошо развитый, одноклеточный мицелий. От воздушного мицелия вырастают плодоносящие гифы — спорангиеносцы, которые заканчиваются шаровидным спорангием (рис. 27). В спорангии развиваются тысячи спор. Наружная поверхность оболочки спорангия шероховатая, густо усеяна игольчатыми кристаллами щавелевокислого кальция.

Муковые грибы часто встречаются в навозе, влажных кормах, на стенах сырых помещений в виде сероватого пушистого налета.

Представители муковых грибов (*Mucor mucedo*, *Rhizopus nigricans* и др.) вызывают у людей и животных поражения кожи, подкожной клетчатки, среднего уха, глаз, легких, сердца и центральной нервной системы. В почве эти грибы принимают активное участие в минерализации органических веществ.

Класс аскомицеты (*Ascomycetes*) — сумчатые грибы с одноклеточным или многоклеточным (септированным) мицелием. Размножаются вегетативным способом (частями мицелия, оидиями, склероциями и почкованием), бесполом (образование конидий) и половым путем, который заканчивается образованием 2, 4, 8, 16 и 32 аскоспор в специальной сумке (аске), расположенной в плодовых телах. Различают три типа плодовых тел (рис. 28): 1) клейстотеции — совершенно замкнутые

плодовые тела округлой формы; они характерны для плектомицетов; 2) перитеции — бутылкообразные плодовые тела с отверстием на вершине; сумки располагаются на дне плодовых тел пучком; такие плодовые тела типичны для пиреномицетов; 3) апотеции — от-

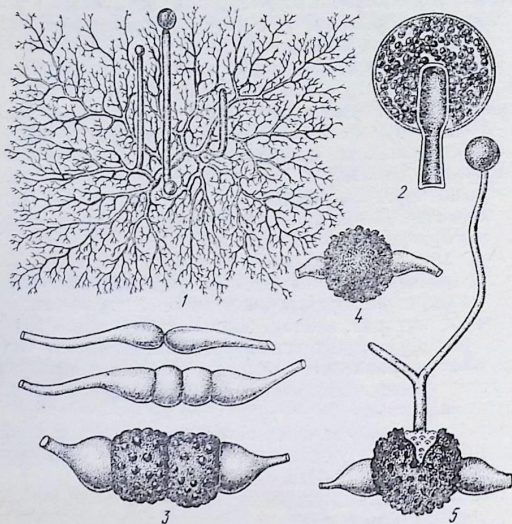


Рис. 27. Спорангии *Mucor racemosus*:

1 — мицелий со спорангиеносцами, 2 — спорангий, 3 — образование зигоспоры, 4 — зигоспора, 5 — прорастание зигоспоры

крытые чашеобразные или блюдцеобразные плодовые тела, растущие на нитях мицелия как на ножке; на поверхности таких шляпок полисадным газоном развиваются сумки и бесплодные гифы — парафизы; эти плодовые тела типичны для дискомицетов.

Класс аскомицетов включает большое количество подклассов, порядков и групп, каждая из которых характеризуется специфическими особенностями.

Наиболее широко распространенные представители

этого класса, имеющие важное практическое значение — роды *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Aspergillus* и др.

Род сахаромыцес (*Saccharomyces*, порядок *Eudomycetales*). Вегетативное размножение у этих грибов осуществляется изоморфным делением клетки, почкованием и образованием хламидоспор. Половое размно-

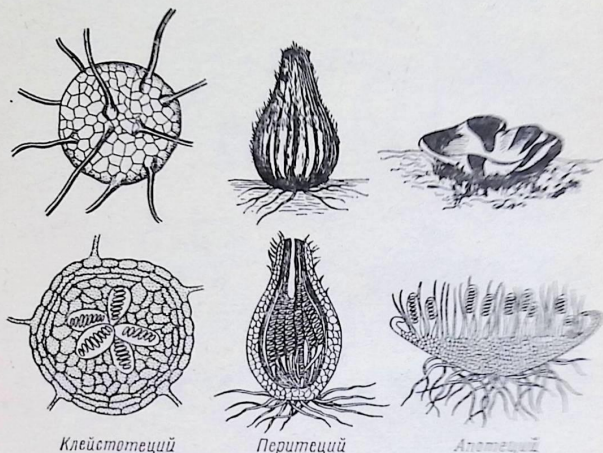


Рис. 28. Внешний вид и поперечный разрез плодовых тел

жение происходит слиянием двух гаплоидных клеток. Слившееся ядро делится два или три раза с образованием четырех или восьми спор в общей сумке — аске. Типичные представители рода — пивные или хлебные дрожжи (*S. cerevisiae*, рис. 29) и винные дрожжи (*S. vini*, *S. ellipsoideus*). Культурные расы пивных и хлебных дрожжей широко используются для производства пива и в хлебопекарной промышленности. Винные дрожжи (*S. vini*, *S. ellipsoideus*) живут на поверхности и в соке плодов, богатых углеводами, например винограда. Они широко используются при производстве вин, спирта и др.

Оба вида дрожжей не образуют гиф мицелия. Vegetативные клетки их имеют овальную, яйцевидную или удлиненную форму. Vegetативное размножение осуществляется почкованием. При условиях, неблагоприятных для вегетативного размножения (недостаток питания, большой доступ кислорода и т. д.), в дрожжевой клетке формируется сумка — аск, в которой развивается по 4—8 аскоспор.

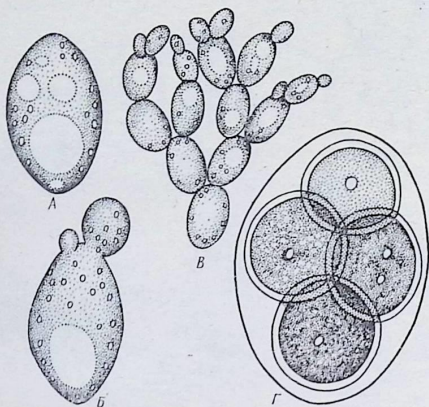


Рис. 29. Хлебные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*): А — отдельная клетка дрожжей; Б — начало почкования; В — почкование; Г — сумка со спорами

Род аспергиллов (*Aspergillus*, порядок Eurotiales) относится к высшим грибам из класса сумчатых. Для них типично бесполое размножение экзоспорами (конидиоспоры). Мицелий их сильно разветвленный, состоит из многочисленных гиф, разделенных межклеточными перегородками (септированных). Плодоносящее тело размещается, как правило, на одноклеточном конидиеносце, имеющем на конце булавовидное утолщение. На утолщении расположены в 1—2 ряда стеригмы, от которых отшнуровываются споры. Черного цвета споры, располагаясь вокруг конидиеносца, напоминают

струи воды, вытекающей из лейки. Отсюда происходит название этого гриба — леечная, или черная, плесень (рис. 30).

После полового процесса у аспергиллов возникают небольшие шаровидные плодовые тела (клейстокарпии) с беспорядочно лежащими в них асками.

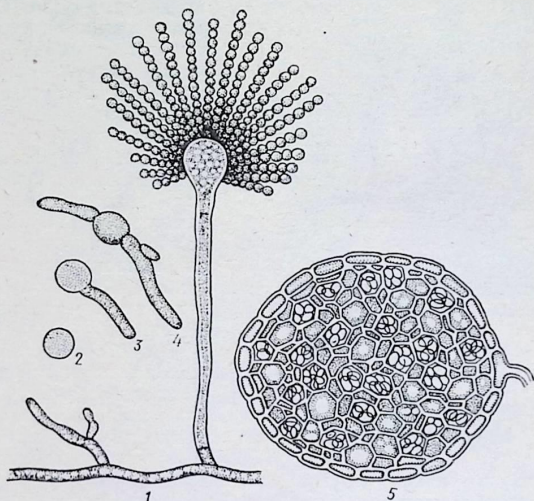


Рис. 30. Гриб *Aspergillus*:

1 — мицелий с конидиеносцами, 2, 3, 4 — прорастающая конидия, 5 — клейстокарпий

Представители этого рода играют большую роль в разложении органических остатков и образовании почвенного гумуса. Отдельные виды их могут вызвать аспергиллёз дыхательных путей, глаз, уха, пищеварительного тракта и общее поражение у людей, сельскохозяйственных животных и птиц.

Род пенициллов (*Penicillium*, порядок Eurotiales) характерен многоклеточным мицелием. Плодоносящее тело располагается на многоклеточном конидиеносце.

це, имеющем на конце мутовчатое разветвление стеригм, напоминающее кисть руки. От стеригм цепочкой отшнуровываются конидии (рис. 31).

При половом размножении женские органы — архикарпии — закручиваются спирально вокруг мужских

антеридиев. Клеточные стенки в местах соприкосновения растворяются, происходит слияние содержимого половых клеток — наступает плазмогамия. На переплетающихся ветвистых гифах с дикарионами образуются сумки, содержащие восемь аскоспор. Вокруг сумок усиленно развиваются и переплетаются гаплоидные гифы гриба, образуя плодовое тело — клейстокарпий.

Виды этого рода широко распространены в природе. Одни из них участвуют в разложении органических веществ и накоплении гу-

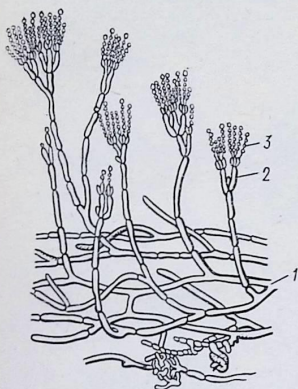


Рис. 31. Гриб *Penicillium*:

1 — мицелий с конидиеносцем, 2 — стеригмы, 3 — конидии

муса в почве, другие, развиваясь, например, на фруктах, овощах, продуктах, кожах, книгах, вызывают их порчу; отдельные виды являются патогенными для людей и животных, поражая кожу, ногти, дыхательные пути и другие органы, а некоторые виды (*Penic. notatum* и *Penic. chrysogenum*) используются для промышленного производства известнейшего антибиотика — пенициллина.

Род спорыньевых (*Claviceps*, порядок Clavicipitales).

Главным представителем этого рода является спорынья (*Claviceps purpurea*), паразитирующая на ржи и других злаковых растениях. Плотные, похожие на рожок лилово-черные склероции спорыньи («маточные рожки») хорошо заметны среди нормальных зерен в колосе зла-

ков (рис. 32). Попавшие в почву (при уборке) склеротии перезимовывают, а весной прорастают, образуя шаровидные плодовые тела на длинных ножках — строммах. В результате происходящего полового процесса в плодовых телах образуются перитеции, содержащие сумки с восемью аскоспорами. Созревшие в сумках аскоспоры высыпаются из плодовых тел и переносятся ветром на цветы злаков. Попав на цветок, аскоспора прорастает в гифу, которая проникает в завязь и образует мицелий. На мицелии образуются конидии. Выделяемый грибом сладковатый сок привлекает насекомых, которые, побывав на больном растении, «нагружают» конидиями и переносят их на здоровые растения.

Спорынья значительно снижает урожай злаковых культур. В склеротиях спорыньи содержатся алкалоиды — эрготоксин, эрготоллин и эргометрин. Эти алкалоиды являются сильнейшим ядом, вызывающим сужение кровеносных сосудов и повышение тонуса гладкой мускулатуры, особенно матки. При скармливании животным зернопродуктов, содержащих склеротии спорыньи выше 0,06%, возникают отравления, сопровождающиеся судорогами скелетной мускулатуры, расстройством деятельности центральной нервной системы, рвотой. Такие отравления могут заканчиваться смертельным исходом.

К аскомицетам относятся также ценные съедобные грибы — трюфели и сморчки. Трюфели образуют подземные плодовые тела темного цвета, похожие по

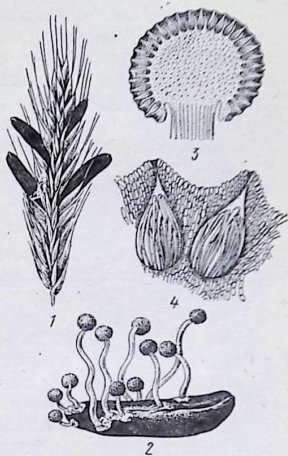


Рис. 32. Спорынья (*Claviceps purpurea*):

1 — колос ржи со склеротиями спорыньи, 2 — прорастание склеротия, 3 — продольный разрез через головку спорыньи, 4 — перитеций с аскоспорами

форме и размерам на клубни картофеля. Плодовые тела сморчков крупные, мясистые, состоят из ножки и шляпки. На складчатой бурой поверхности шляпки слоями располагаются сумки со спорами.

Класс базидиомицетов (Basidiomycetes) представляет группу грибов с многоклеточным членистым мицелием.

Вегетативное размножение у них осуществляется частицами мицелия, оидиями и хламидоспорами. Бесполое размножение происходит конидиями, которые у некоторых видов имеют специальные названия. Основным способом размножения у них является половой процесс (соматогамия), а основными органами размножения — базидии с базидиоспорами. У одних грибов базидии одноклеточные (холобазидии) с четырьмя базидиоспорами, расположенными на коротких стеригмах. У другого подкласса базидии многоклеточные (фрагмобазидии), состоящие чаще из четырех вытянутых клеток, несущих по одной споре.

К грибам с одноклеточными базидиями относятся широко известные шляпочные грибы, трутовики, домовые, головневые и ржавчинные грибы.

Семейство пластинниковые (Agaricaceae, порядок Agaricales).

Шляпочные грибы имеют плодовое тело в виде шляпки, сидящей на ножке. Нижняя поверхность шляпки состоит из радиально расходящихся пластинок (гименофоры), например у шампиньонов (*Agaricus campestris*), у опенка (*Armillaria mellea*), у груздей (*Lactarius piperatus*), или из многочисленных трубочек, например у белого гриба (*Boletus edulis*), у подберезовика (*B. scaber*), у масленка (*B. luteus*) и др. Многие пластинниковые грибы ядовиты для людей и животных, например красный мухомор (*Amanita muscaria*), бледная поганка (*Am. phalloides*) и др.

Мицелий большинства шляпочных грибов развивается в почве и вступает в тесное взаимоотношение с корневой системой деревьев, образуя микоризу.

Трутовики — опасные разрушители древесины. Типичным представителем является трутовик настоящий (*Fomes fomentarius*), имеющий копытообразное плотное тело. Гриб поселяется на живых деревьях (береза, бук и др.) и ведет паразитический образ жизни. После гибели деревьев он продолжает жить на мертвом субстрате как сапрофит.

Домовые грибы поселяются чаще всего на деревянных частях зданий. Типичным представителем является *Merulius lacrymans*. Развиваясь на поверхности пораженной древесины, гриб образует белый, ватообразный объемистый мицелий с желтоватыми или розовыми пятнами и каплями водянистой жидкости.

Головневые грибы (*Ustilaginales*) поражают преимущественно зерновые культуры, вызывая заболевание — головню (рис. 33).

Название это дано потому, что пораженные колосья кажутся обожженными или обуглившимися, что обусловлено наличием в зерновках или в колосе сажеобразной массы, состоящей из хламидоспор.

Головневые грибы наносят значительный ущерб сельскому хозяйству, снижая урожай зерновых культур от 10 до 50%.

Ржавчинные грибы (*Uredinales*) имеют сложный цикл развития, отдельные стадии которого проходят на различных видах растений-хозяев. Они обладают большим разнообразием форм спорониев, чередующихся в определенной последовательности. Поселяясь в определенных стадиях своего развития под эпидермой листовых пластинок и стебля, они обуславливают появление линейно расположенных оранжевых пятен, похожих на ржавчину, — отсюда и произошло название возбудителя. Типичным представителем этих грибов является хлебная ржав-

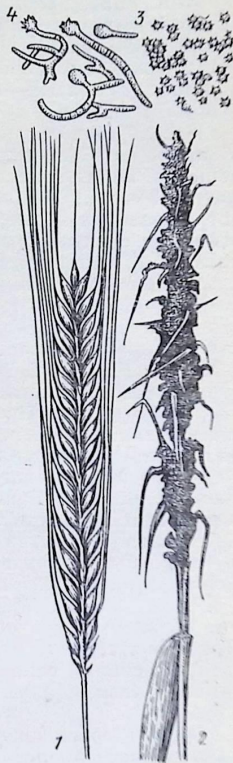


Рис. 33. Пыльная головня ячменя (*Ustilago nida*):

1 — здоровый колос, 2 — пораженный колос, 3 — хламидоспоры, 4 — проросшие споры

чина *Puccinia graminis*, паразитирующая на барбарисе и пшенице.

Класс несовершенные грибы (Fungi imperfecti) характеризуется тем, что большинство видов имеет многоклеточный мицелий и размножается бесполом способом — образованием конидий. Некоторые их представители образуют оидии или почки, а некоторые вообще не имеют каких-либо специальных органов размножения. В этот класс включены все грибы, принадлежность которых к другим классам установить не удалось, а половой цикл развития у которых неизвестен.

По мере изучения несовершенных грибов их относят в класс сумчатых, базидиальных или других грибов, в цикл развития которых они входят.

Несовершенные грибы широко распространены в природе. Они вызывают разложение органических веществ, порчу пищевых продуктов, хлопка, шерсти, бумаги. Многие представители несовершенных грибов встречаются в почве, на зеленых растениях, на зерне. Имеются среди них и виды, патогенные для людей, животных и растений. Наибольший интерес представляют следующие представители этого класса.

Род *Phoma* имеет разветвленный многоклеточный мицелий. Часто поселяются на корешках растений, образуя так называемую эндотрофную микоризу.

Род *Fusarium*. Мицелий многоклеточный, конидии серповидно изогнутые, разделенные перегородками на несколько частей. Некоторые виды этого рода образуют гиббереллиновую кислоту (стимулятор роста); другие вызывают заболевания растений, например *Fus. nivale* Ces. вызывает снежную плесень злаков, *Fus. vasinfectum egyptiacum* Fahmy — увядание хлопчатника, *Fus. solani* Mart. — гнили картофеля и др.; третьи образуют токсические вещества, вызывающие отравления у людей и животных («пьяный хлеб»), — *Fus. graminearum* Schw., фузариотоксикоз — *Fus. sporotrichioides*.

Род *Botrytis*. Мицелий многоклеточный, конидиеносец членистый, тройко разветвленный, споры овальные. Представитель этого рода *Botr. cinerea* вызывает кагатную гниль сахарной свеклы при ее хранении, нанося этим большой вред сахарной промышленности.

Среди несовершенных грибов имеются представители, вызывающие заболевания кожи у человека и животных,

так называемые дерматомикозы (*Microsporon*, *Trichophyton* и др.), кандидомикозы (*Candida albicans*), бластомикозы (*Blastomyces dermatitidis*).

Хищные грибы. Некоторые из несовершенных грибов способны ловить и переваривать микроскопических животных, живущих в почве, например амеб, коловраток, личинок нематод и др. Так, *Trichothecium* — гриб, обитающий в почве, образует короткие боковые ответвления мицелия, закрученные в кольца — петли (рис. 34). Петли

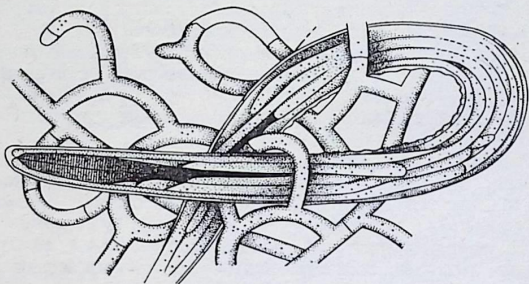


Рис. 34. Захватывание нематоды хищным грибом *Trichothecium*

очень клейкие, а внутренняя поверхность кольца чувствительна к прикосновению. Когда нематода или другое микроскопическое животное приклеится и коснется к внутренней поверхности петли, клетки ее мгновенно набухают, закрывают просвет и крепко сжимают жертву. Все усилия животного освободиться оказываются тщетными, и оно погибает. Если даже нематодe удастся оторвать петлю от мицелия, кольцо продолжает сжиматься. Клетки петли выделяют ферменты, разрушающие тело животного. Затем от клеток в тело животного прорастает вегетативный мицелий, под воздействием ферментов которого животное переваривается и гибнет.

В настоящее время предпринимаются попытки практического использования хищных грибов в борьбе с нематодами сельскохозяйственных растений и животных.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп с осветителем, предметные стекла, бактериологическая петля, препаровальные иглы, физиологический раствор в пробирке, метиленовый синий или фуксин, чистые культуры грибов в чашках: *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в жидкой культуре.

Задание. 1. Приготовить живые культуры (раздавленная капля), изучить строение одноклеточного и многоклеточного мицелия и органы бесполого размножения у грибов *Mucor*, *Aspergillus* и *Penicillium*.

2. Приготовить мазок из культуры дрожжей, окрасить его простым методом и просмотреть под иммерсией.

3. Микроскопическую картину всех препаратов зарисовать в альбом.

Методические указания. Морфологию грибов лучше изучать в препаратах живых культур в раздавленной капле. Для изготовления препарата поступают следующим образом:

на середину чистого предметного стекла наносят каплю дистиллированной воды или физиологического раствора;

стерильной бактериологической петлей или препаровальной иглой снимают воздушный мицелий гриба с поверхности питательной среды;

переносят захваченный мицелий на предметное стекло в каплю воды;

препаровальными иглами разрывают мицелий на отдельные кусочки;

препарат накрывают покровным стеклом, помещают на столик микроскопа и просматривают вначале при малом, а затем при среднем увеличении микроскопа при опущенном конденсоре;

для лучшей видимости строения мицелия в каплю под покровное стекло можно добавить небольшое количество краски (одну каплю фуксина).

Для изучения морфологии дрожжей каждый студент готовит мазок из культуры хлебных дрожжей, выращенных в 10%-ном растворе сахара. Мазки фиксируют над пламенем, окрашивают фуксином или метиленовым синим и просматривают под иммерсией. При изучении мазков обращают внимание на форму дрожжевых кле-

ток, наличие в их протоплазме включений, отыскивают делящиеся клетки с почками.

Строение мицелия и органов бесполого размножения можно изучать в колониях грибов, выращенных на плотной питательной среде. Для этого культуры грибов микроскопируют непосредственно на чашках или в пробирках при малом увеличении.

Морфология вирусов

Вирус (Virus) в переводе — яд животного происхождения. Вирусы объединены в отдельное царство Vira. Характерными особенностями вирусов являются очень малые размеры — от 10 до 350 нм, фильтруемость через мелкопористые бактериальные фильтры и облигатный паразитизм, т. е. способность жить и размножаться только внутриклеточно. Они могут паразитировать в животных, растительных и бактериальных клетках, вызывая в конечном итоге их гибель.

У вирусов принято различать две чередующиеся фазы в жизненном цикле — внеклеточную и внутриклеточную. Во внеклеточной фазе, т. е. во внешней среде, вирус существует в виде бесклеточной, инертной инфекционной частицы. Будучи бесклеточным существом, вирусы, однако, обладают выраженной симметрией и построены

из определенного числа мелких «деталей», так называемых субъединиц, образующих единое целое — вирусную частицу, или вирион (рис. 35). Вирион состоит из одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты — ДНК и РНК. Большинство вирусов содержит двухцепочечную ДНК или одноцепочечную РНК. Однако ряд вирусов содержит одноцепочечную ДНК (колифаг fd) или двухцепочечную РНК (реовирусы). Нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) составляет сердцевину или

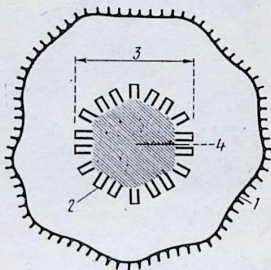


Рис. 35. Обобщенная схема строения вируса:

1 — капсид, 2 — капсомеры, 3 — вирион, 4 — ДНК или РНК

«ядро» вириона. Она заключает в себе генетическую информацию, определяющую наследственность вируса.

Вокруг нуклеиновой кислоты располагается плотная белковая оболочка — капсид. Капсид состоит из отдельных структурных субъединиц, представляющих собой одну или несколько полипептидных цепей. Капсиды

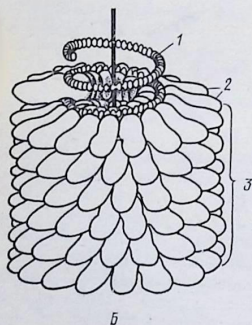
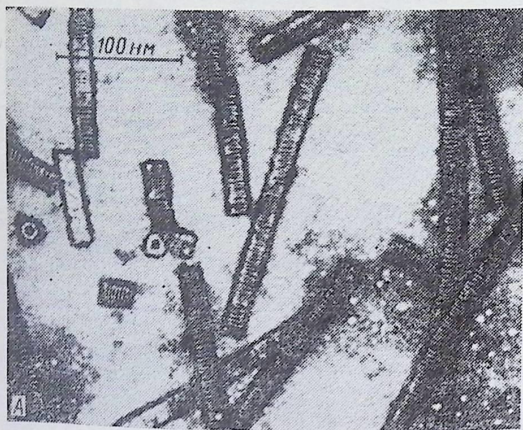


Рис. 36. Электронная микрофотография вируса табачной мозаики — А и его схема — Б: 1 — РНК, 2 — капсомеры, 3 — капсид

у различных вирусов построены по-разному. Они состоят из различного числа симметрично расположенных морфологических субъединиц, называемых капсомерами (рис. 36). Эти капсомеры подобно своеобразному белковому «чastoкoлу» окружают полость, в которой расположена нуклеиновая кислота.

Для капсидов вирионов характерны два типа симметричной укладки субъединиц: спиральная симметрия со спиральной структурой и кубическая симметрия со структурой капсида, близкой к сфероиду.

У крупных и сложных по химическому составу вирионов этот «нуклеотид» может быть заключен в особую внешнюю оболочку (мембрану), которая называется суперкапсидом или пеплосом. Она состоит из липопротеидов и во многих случаях содержит некоторые компоненты клетки хозяина и вирусспецифические белки. У мелких и более простых по химическому составу вирусов внешняя оболочка отсутствует. Многие мелкие вирусы ведут себя подобно химическим веществам и во внеклеточной фазе могут быть получены в кристаллическом виде.

Во внутриклеточной фазе вирус существует в клетке хозяина в виде реплицирующейся молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК и РНК). Вирусы размножаются не делением, а путем репликации (синтеза) вирусной нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислотой клетки-хозяина, инфицированной вирусом.

Процессы инфицирования вирусом клетки-хозяина различны у вирусов бактерий, растений и животных. Проникшая тем или иным путем в клетку-хозяина нуклеиновая кислота вириона присоединяется к ДНК клетки. С этого момента начинается репликация (синтез) вирусной нуклеиновой кислоты. Генетический материал вируса не только реплицируется в клетке-хозяине, но и служит генетическим детерминантом для синтеза клеткой специфических вирусных белков, из которых строятся капсомеры и капсид. В ходе синтеза белков и репликации в клетке-хозяине накапливается большое число молекул вирусной нуклеиновой кислоты и субъединиц вирусного капсида. Они спонтанно соединяются друг с другом, образуя полные нуклеокапсиды. Процесс размножения вируса завершается выходом из клетки-хозяина зрелых вирионов. В клетках животных этот процесс часто завершается выходом вируса через

мембрану клетки, а у бактерий — лизисом клетки-хозяина под действием индуцируемого вирусом фермента.

Важным и решающим для размножения вируса фактором является специфичность в отношении хозяина. Все вирусы, в том числе и бактериофаги, ограничены в выборе клетки-хозяина. Например, вирусы растений или рыб не могут поражать клетки млекопитающих, и наоборот, вирусы млекопитающих не способны развиваться в клетках растений или бактерий.

Достаточно четкой классификации вирусов до настоящего времени нет. По отношению к организму-хозяину вирусы подразделяются на следующие группы: а) паразиты бактерий и других низших — бактериофаги, актинофаги; б) паразиты высших растений; в) паразиты млекопитающих.

Форма вирусов может быть шаровидная, палочковидная, кубоидальная, нитевидная.

Изучение морфологии вирусов проводится с помощью электронного микроскопа. Скопление вирусных частиц или специфически измененные участки в пораженной вирусом клетке можно изучать с помощью обычного светового микроскопа. Эти скопления получили название внутриклеточных включений и элементарных телец. Они специфичны по своей морфологии для отдельных вирусов и представляют собой их колонии в клетках-хозяевах.

Глава III

ОБЩАЯ ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ

Питание микроорганизмов

Для того чтобы жить, развиваться, размножаться, передвигаться, микроорганизмы должны питаться. Они должны перерабатывать вещества, поступающие из внешней среды, в вещества собственного тела и выделять в окружающую среду продукты обмена. Условия существования живого организма, в том числе и микробов, находятся в постоянной зависимости и неразрывной связи с условиями окружающей среды.

Живая клетка — это высокоорганизованное состояние материи, находящейся в постоянном самообновлении химических составных частей. Для создания такой организации и для ее поддержания во время роста, деления, движения и даже в состоянии покоя вегетативная клетка нуждается в постоянном притоке энергии и «строительных» материалов. Поступившие в клетку питательные вещества, претерпевая ряд последовательных ферментативных реакций, используются для образования клеточных структур и в качестве энергии, необходимой для клеточных синтезов и других энергозависимых процессов. Эту энергию и строительные материалы клетка получает в процессе обмена веществ. Обмен веществ, или метаболизм, клетки можно условно разделить на три этапа. Первый этап метаболизма — расщепление макромолекул питательных веществ на небольшие моно- и димерные фрагменты, легко проникающие извне внутрь клетки. Это катаболизм, или распад питательных веществ. У большинства микроорганизмов он протекает под действием экзоферментов вне клетки. На втором этапе проникшие внутрь клетки фрагменты питательных веществ превращаются в ряд органических кислот и фосфорных эфиров. Этот второй этап называется промежуточным обменом, или амфиболизмом. Эти два этапа метаболического пути переходят

один в другой незаметно. Из разнообразных низкомолекулярных соединений синтезируются основные структурные компоненты, или строительные блоки клетки — аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, фосфаты сахаров, органические кислоты и другие метаболиты, представляющие собой конечные продукты длинных цепей внутриклеточного биосинтеза. Из них строятся полимерные макромолекулы — белки, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки, запасные питательные вещества и т. п., т. е. те молекулы, из которых состоит клетка. Этот третий этап биосинтеза клеточных веществ (синтез строительных блоков и синтез полимеров) составляет синтетическую ветвь метаболизма, или анаболизм. Он осуществляется внутри клеток под действием эндоферментов.

Скорость поступления и превращения питательных веществ в клетке, а также вывод из нее продуктов обмена зависят от ряда факторов. Основную роль играют в этих процессах активность фермента, регулируемая стационарной концентрацией конечных продуктов биосинтеза, концентрация питательных веществ в клетке и в окружающей среде, величина молекул питательных веществ и их химическая структура, электрический заряд, pH среды.

Все микроорганизмы нуждаются в так называемых органогенных веществах: углероде, кислороде, азоте, водороде. В значительных количествах они потребляют фосфор и серу. Кроме того, они нуждаются в так называемых макроэлементах (Fe, Ca, K, Mg, Mn), микроэлементах (Cu, Co, B, Mo) и факторах роста (витамины). По отношению к источникам углеродного питания их делят на автотрофов и гетеротрофов.

Автотрофные микроорганизмы удовлетворяют свои потребности в углероде за счет углекислоты атмосферы. К ним относятся многие виды почвенных бактерий (например, нитрифицирующие бактерии, серобактерии, железобактерии и др.). Они получают необходимую энергию за счет окисления простейших минеральных веществ (например, аммиака, сероводорода и др.). Этот процесс называется хемосинтезом.

Для значительной группы микроорганизмов лучшим источником углерода являются органические соединения. Такие микроорганизмы называются гетеротрофами. В состав этой группы входят сапрофиты, или

метатрофы (возбудители брожений, гнилостные микробы), питающиеся мертвыми остатками животных и растительных тканей, и паразиты, или паратрофы, питающиеся веществами живого организма (возбудители различных инфекций у животных и растений). Среди паратрофов имеются строгие паразиты, живущие только за счет живой клетки (вирусы, риккетсии).

Необходимую энергию гетеротрофные микроорганизмы получают за счет окисления или брожения органических соединений. Источником углерода для них могут быть самые различные органические соединения, начиная от моносахаров до сложных углеводов, белков и жиров.

Между хемоавтотрофами и гетеротрофами имеются промежуточные группы микроорганизмов, так называемые факультативные авто- и гетеротрофы. Кроме того, имеются микроорганизмы, способные в определенных условиях переходить с одного типа питания на другой. Даже паратрофные микроорганизмы (за исключением вирусов и риккетсий) могут хорошо усваивать различные органические соединения из мертвых субстратов. Это делает возможным их культивирование на искусственных питательных средах и в достаточной степени длительное существование на положении сапрофитов в почве, воде и других субстратах.

Приготовление питательных сред

Для получения чистых культур микроорганизмов, изучения их морфологических и физиологических свойств, а также накопления больших количеств микробов в лабораторных условиях производят выращивание (культивирование) их на питательных средах.

Любая питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для роста и размножения данного микроба, в легко усвояемой форме, быть изотоничной, иметь оптимальную влажность, вязкость, рН, окислительно-восстановительный потенциал; быть стерильной и, по возможности, содержать основные микроэлементы, витамины, пуриновые и пиримидиновые основания, незаменимые аминокислоты. Эти компоненты выполняют роль катализаторов метаболических процессов или включаются в состав клеточных белков и нуклеино-

вых кислот, которые бактерии не способны синтезировать из других ингредиентов.

При культивировании микробов готовят питательные среды такого состава, который наилучшим образом соответствует требованиям той или иной физиологической группы микробов или проявлению их определенных свойств в зависимости от поставленной цели. Поэтому для выделения и изучения свойств микробов применяется большое количество сред, различающихся по происхождению, консистенции, составу и назначению.

В зависимости от происхождения среды подразделяются на естественные и искусственные. Из последних выделяют в особую группу синтетические среды.

Естественными средами называются такие, которые представляют собой натуральный продукт — молоко, яйцо, овощи или естественный субстрат — свернутая сыворотка крови, желчь и др.

Искусственные среды готовят по определенным рецептам из различных настоев или отваров животного или растительного происхождения с добавлением неорганических солей, углеводов и азотистых веществ.

Синтетические среды готовят из химически чистых веществ (солей, углеводов, аминокислот, витаминов и др.), взятых в определенных соотношениях.

По консистенции различают среды жидкие, полужидкие и плотные (твердые). Жидкие среды состоят из воды и растворенных в ней веществ (мясная вода, мясо-пептонный и бобово-пептонный бульон и др.). Плотные искусственные среды готовят путем добавления к жидкой среде уплотняющих веществ — желатины (10—15%), агар-агара (1—2%).

Полужидкие среды содержат те же уплотняющие вещества, но в меньшем количестве (0,2—0,3% агар-агара).

По назначению питательные среды делятся на обычные, специальные, селективные и дифференциально-диагностические.

Обычные среды применяются для выращивания большинства микроорганизмов. К ним относятся бобово-пептонный и мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и др.

Приготовление мясной воды. Свежее говяжье или конское мясо освобождают от костей, сухожи-

лий, жира и фасций, измельчают в мясорубке или нарезают ножом мелкими кусочками. Навеску измельченного мяса заливают двумя объемами дистиллированной или водопроводной воды и оставляют для экстрагирования в холодильнике (при температуре 4—6°С) на 18—24 ч или помещают в термостат с температурой 37°С на 2 ч. Настой кипятят до просветления (5—7 мин), охлаждают при комнатной температуре и фильтруют через ватный или бумажный фильтр; фильтрат измеряют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой. Разливают по флаконам, стерилизуют в автоклаве при 120°С (1 атм) в течение 30—40 мин и используют по назначению.

Правильно приготовленная мясная вода представляет слабокислую (рН 6,2) прозрачную, соломенно-желтоватую жидкость, не содержащую белков. В ней содержится небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ.

Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ). К мясной воде прибавляют 1% пептона и 0,5% хлористого натрия, кипятят 1—2 мин при помешивании, затем охлаждают и определяют рН. Добавлением щелочи (20% р—р NaOH) или 1 н. кислоты устанавливают рН среды 7,4—7,6. Для стабилизации рН рекомендуется к бульону добавлять фосфатные буферные смеси. Кипятят 30—45 мин для выпадения осадков, затем охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Проверяют и доводят рН до 7,4—7,6, разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют в автоклаве при 120°С (1 атм) в течение 15—20 мин.

Такой мясо-пептонный бульон пригоден для выращивания большинства бактерий. Из него легко приготовить ряд сред специального назначения.

Приготовление мясо-пептонного агара (МПА).

1. К приготовленному мясо-пептонному бульону добавляют 2—3% мелко нарезанного хорошо промытого агара¹.

2. Смесь кипятят или прогревают в автоклаве до полного расплавления агара.

¹ Агар — вещество полисахаридной природы, получаемое из морских водорослей *Laminaria* и *Ahnfeltia*. Плавится при 100°, а застывает при 40—45°С, образуя студенистую массу.

3. Охлаждают до 50°C и для просветления добавляют белок куриного яйца, тщательно взбитого в двойном количестве холодной воды (белок 1 яйца на 1 л среды). Среду прогревают в автоклаве при 0,5 атм в течение 45 мин. Белок адсорбирует взвешенные в среде частицы, свертывается при высокой температуре и оседает хлопьями на дно.

4. Агар фильтруют через слой ваты или фильтровальную бумагу в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с подогревом.

5. Проверяют и исправляют pH.

6. Разливают через стеклянную воронку с резинкой и зажимом в пробирки, флаконы, колбы и т. д., следя за тем, чтобы не смочить их краев.

7. Стерилизуют в автоклаве при 120°C (1 атм) в течение 15—20 мин.

8. Пробирки с горячим жидким агаром извлекают из автоклава и раскладывают на столе в наклонном положении. Агар растекается по стенке пробирки и при застывании получается скошенным. Для получения агара столбиком пробирки охлаждают в вертикальном положении.

Мясо-пептонный агар является основной плотной средой и служит для получения изолированных колоний микробов на питательной среде. Он употребляется в виде «простого» агара или после прибавления к нему дополнительных веществ (например, углеводов, крови и др.) и индикаторов в виде сложных дифференциально-диагностических или так называемых селективных сред.

Приготовление растительных сред. Для культивирования многих бактерий можно пользоваться как стерильным картофелем, нарезанным в виде ломтиков или цилиндриков, так и средами, содержащими картофель или крахмал. Для приготовления сред отбирают здоровые неповрежденные клубни картофеля, тщательно промывают их в водопроводной воде, очищают от кожуры, глазков и испорченных участков. Очищенный картофель снова моют в водопроводной воде и опускают на 2—3 ч в 1%-ный раствор двууглекислой соды для нейтрализации содержащихся в нем кислот. Из приготовленных клубней нарезают ножом ломтики толщиной 2 мм или вырезают специальной трубочкой цилиндрики, которые разрезают по диагона-

ли на 2 клина. Ломтики картофеля натирают небольшим количеством мела и укладывают в чашку Петри, на дно которой помещают 1—3 листа фильтровальной бумаги. Среду стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

Клинья картофеля обрабатывают мелом или выдерживают 1—2 ч в 1%-ном растворе соды, подсушивают фильтровальной бумагой и помещают широким концом вниз в специальные картофельные пробирки (пробирки Ру), имеющие перехват внизу или в обычные пробирки, на дно которых помещена стеклянная трубочка или кусочек ваты. В пробирки до перехвата наливают физиологический раствор или 5%-ный глицериновый бульон. Затем стерилизуют среду при 1 атм в течение 30 мин.

Картофельная вода. 200 г протертого картофеля заливают 1 л водопроводной воды и кипятят 15 мин. Отвар фильтруют через бумажный фильтр или слой ваты, разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин. Из картофельной воды готовят плотную среду добавлением 2% агара. Среду кипятят, устанавливают рН и стерилизуют в автоклаве 30 мин при 1 атм.

Бобовый отвар. Это хороший питательный субстрат для развития клубеньковых бактерий, обычной гнилостной микрофлоры и плесневых грибов. 50 г семян бобовых (горох, фасоль, бобы) заливают 1 л воды и кипятят в течение 1 ч или прогревают в автоклаве при 0,5 атм в течение 20 мин. Отвар фильтруют через вату или фильтровальную бумагу, определяют и устанавливают необходимый рН, прибавляют 1% сахара, разливают по пробиркам и стерилизуют при 1 атм в течение 30 мин.

Сенные отвары. 100 г сухого высококачественного, лучше бобового, сена кипятят в 1 л водопроводной воды в течение 30 мин. Полученный отвар фильтруют, определяют и устанавливают рН, добавляют необходимые соли (лучше K_2HPO_4) и сахар (1%), разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин.

Почвенный агар. Из воздушно-сухой почвы удаляют растительные остатки, кусочки стекла, камней и других плотных примесей. Почву измельчают в ступке и просеивают через сито с диаметром отверстий

1 мм. Помещают почву в колбу и заливают дистиллированной водой в отношении 1:5 или 1:9. Суспензию взбалтывают на качалке в течение 5—10 мин, а затем добавляют к ней 1,5—2% агара. Стерилизуют среду в автоклаве при 120°С в течение 1 ч. Стерилизацию повторяют через 1—2 сут.

Специальные среды применяются для выделения и культивирования определенных групп или видов микробов. Например, среда Омелянского — для выделения возбудителей анаэробного разложения клетчатки, среда Чапека — для культивирования грибов и др.

Среда Омелянского

аммоний фосфорнокислый	1,0 г
калий фосфорнокислый	1,0 г
магний сернокислый	0,5 г
натрий хлористый	следы
кальций углекислый	20,0 г
фильтровальная бумага	несколько кусочков
дистиллированная вода	1000,0 мл

Среда Чапека:

глюкоза (сахароза)	30,0 г
натрий азотнокислый	2,0 г
калий фосфорнокислый однозамещенный	1,0 г
магний сернокислый	0,5 г
калий хлористый	0,5 г
железо сернокислое	0,01 г
вода водопроводная	1000,0 мл

Для приготовления плотной среды Чапека добавляют 2—4% агара к жидкой среде.

Элективные среды пригодны для развития одного приспособившегося к данным условиям существования вида микробов. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их сильно задерживается. К таким средам относятся накопительные среды С. Н. Виноградского для большинства почвенных микроорганизмов.

Дифференциально-диагностические среды применяются для изучения биохимических свойств микробов

и для выделения чистых культур некоторых микробов. Они позволяют выявить выделяемые микробами ферменты, одни из которых расщепляют в различной степени белки и углеводы, а другие вызывают реакции окисления и восстановления. Сюда относятся жидкие среды Гисса с углеводами, плотные среды с индикаторами — Эндо, Левина, Плоскирева и др.

Среды Гисса. К 1%-ной пептонной воде pH-7,1 прибавляют 0,5—0,6% соответствующего углевода (глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, маннита и др.) и 0,5% индикатора Андрее (0,5 г кислого фуксина в 100 мл 1 н. раствора NaOH). Среды разливают по 4—5 мл в стерильные пробирки, на дно которых перед стерилизацией помещают узкий поплавочек. Стерилизуют среды текучим паром 2—3 раза по 30 мин через каждые 24 ч или однократно паром под давлением 0,5 атм 30 мин. Вместо жидких сред Гисса часто применяют полужидкие среды, содержащие 0,3—0,5% агар-агара и индикатор РВ. При сбраживании углеводов под действием ферментов среда изменяет цвет, а при образовании CO_2 в поплавке скапливается газ.

Среда Эндо. К 100 мл стерильного расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 1 г лактозы, растворенной и прокипяченной в 5 мл дистиллированной воды, и 1 мл насыщенного спиртового основного фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агару 10%-ным водным раствором сульфата натрия до бледно-розового оттенка. Среду хорошо перемешивают, разливают в стерильные чашки и перед посевом подсушивают в термостате. Бактерии (*E. coli*), ферментирующие лактозу с образованием кислоты, образуют на этой среде красные колонии, а не разлагающие лактозу — бесцветные.

Среда Левина. К 100 мл стерильного расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 2 г лактозы, растворенной и прокипяченной в 5 мл дистиллированной воды, 1,5 мл подогретого 0,5%-ного раствора метиленовой синей, 1,5 мл подогретого 2%-ного раствора эозина (стерильные) и 0,2 г двухосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4), растворенного в небольшом количестве воды.

Среду хорошо перемешивают, разливают в стерильные чашки Петри, чашки перед посевом подсушивают в термостате. Колонии ферментирующих лактозу бак-

терий на этой среде темного цвета, не ферментирующих — бесцветные.

В особую группу выделяют селективные среды, на которых ведется селекция микробов против какого-то признака, например среда с примесью пенициллина селективна для пенициллиноустойчивых бактерий.

В настоящее время большое количество питательных сред готовят по специальным рецептам на фабриках и выпускают в виде сухих порошков или жидких концентратов.

Определение рН питательной среды. Рост микробов, их морфология и физиологические свойства проявляются только на питательной среде, имеющей оптимальный рН для данного вида микроба. Для большинства бактерий оптимум рН 7,0—8,5, т. е. они развиваются в слабощелочной среде, в то время как плесневые грибы и дрожжи развиваются в кислой среде при рН 6,8—4,5.

Самым простым методом определения реакции среды является определение с помощью лакмусовой бумажки. Но этот метод очень неточный и не применим в микробиологической практике.

Весьма точным и удобным способом является определение в среде концентрации водородных ионов (H^+) колориметрическим путем в специальных приборах — компараторах Михаэлиса.

В настоящее время рН питательных сред определяют на потенциометрах.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Мясной фарш, бутыл с дистиллированной или водопроводной водой, колбы конические на 200 мл, водяные баки или кастрюли, электроплитки, пептон, сухой агар, поваренная соль, весы с разновесами, роговые ложечки, воронки для разлива питательной среды, 0,1 н. растворы едкой щелочи и соляной кислоты, компараторы для определения рН, пипетки градуированные на 2,0—5,0—10,0 мл, стерильные пробирки и чашки Петри.

Задание. Отвесить 50 г фарша, поместить его в колбу, настоять и приготовить мясную воду, из которой приготовить мясо-пептонный бульон (МПБ). Определить рН приготовленного мясо-пептонного бульона и довести его до 7,6. Определить требуемое количество раствора щелочи для исправления рН в 1 л мясо-пеп-

тонного бульона и разлить МПБ по пробиркам. Приготовить мясо-пептонный агар по прописи и разлить МПА в пробирки. Простерилизовать питательные среды в автоклаве (демонстрация), затем приготовить скошенный агар в пробирках и агаровые пластинки в чашках Петри.

Методические указания. Два студента отвешивают 50 г мясного фарша, помещают его в колбу, заливают двойным объемом воды и готовят мясную воду согласно прописи, настаивая фарш в термостате при температуре 37°С в течение 2 ч. Эту работу целесообразнее выполнить сотрудникам кафедры и продемонстрировать студентам последовательность операций.

Из мясной воды студенты готовят по прописи мясо-пептонный бульон, самостоятельно отвешивая и добавляя ингредиенты.

Определяют рН мясо-пептонного бульона и доводят его до 7,4—7,6. Производят расчет и исправляют рН во всем объеме приготовленной среды.

Каждый студент наливает МПБ в две пробирки. Из оставшегося объема мясо-пептонного бульона готовят мясо-пептонный агар по прописи и разливают через воронку в три пробирки на $\frac{1}{3}$ объема. При разливе необходимо следить за тем, чтобы не облить питательной средой края пробирки. Пробирки со средой закрывают ватными пробками, помещают в проволочную корзинку или банку. Пробирки и колбы с оставшейся средой помещают в автоклав и стерилизуют в течение 30 мин при давлении в 1 атм. Затем среды извлекают из автоклава и охлаждают, предварительно уложив пробирки с МПА в наклонное положение для получения скошенного агара. МПА из колб разливают по чашкам Петри.

Стерилизация

Стерилизация, или обеспложивание,— это полное уничтожение микроорганизмов, их спор и всего живого в питательных средах, материале, посуде, инструментах и других предметах лабораторного обихода. Стерилизация осуществляется различными приемами и является непременным условием успешной работы микробиолога при употреблении питательных сред, инструментов и посуды, свободных от посторонних микроорганизмов.

Наиболее часто применяется химическая и физическая стерилизация.

Химическая стерилизация основана на губительном действии химических веществ на микроорганизмы. Она применяется для обработки вакцин, сывороток и других биопрепаратов, консервируемых различными антисептиками (хлороформ, хинозол, мертиолат и др.).

Химические вещества применяются также для уничтожения патогенных (болезнетворных) микробов в объектах внешней среды: на рабочем месте, в помещениях, в рабочей одежде, на руках и т. д. В этих случаях говорят о дезинфекции.

Для дезинфекции применяют 3—5%-ный водный раствор фенола, 0,5—2%-ный раствор формалина, 10%-ный раствор хлорной извести, 0,5—3%-ный раствор хлорамина, растворы иода, сулемы и др.

К физическим методам стерилизации относятся: стерилизация высокой температурой, ультрафиолетовыми лучами, радиоактивными излучениями, ультразвуком, холодная стерилизация фильтрованием через специальные бактериальные фильтры.

Стерилизация высокой температурой — самый надежный и наиболее распространенный физический метод. Она проводится прокаливанием предметов на пламени горелки (фламбирование), кипячением, сухим жаром (горячим воздухом), перегретым паром под давлением и текущим паром.

Прокаливание на пламени — самый быстрый и надежный способ стерилизации. Этим методом стерилизуют бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла, пастеровские пипетки и другие мелкие инструменты.

Для стерилизации обрабатываемый предмет несколько раз проводят через пламя горелки. При прокаливании происходит сгорание микробов и их спор. Следует, однако, иметь в виду, что прокаливание режущих инструментов приводит к их порче, а стеклянные предметы часто лопаются или плавятся, что ограничивает возможность этого метода.

Кипячение — простейший способ стерилизации игл, шприцев, хирургических инструментов. Проводится в специальных стерилизаторах в течение 10—15 мин (рис. 37). Добавление к воде 1—2% соды значительно

повышает стерилизующее действие кипячения и устраняет жесткость воды, что предохраняет металлические предметы от ржавчины после кипячения. Этот метод не обеспечивает полной стерилизации, так как споры некоторых бацилл и клостридий выдерживают кипячение в течение нескольких часов.

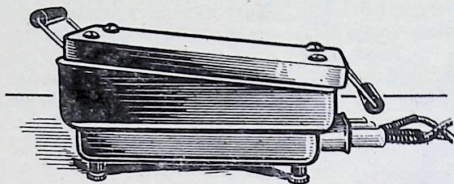


Рис. 37. Стерилизатор

Стерилизация сухим жаром или горячим воздухом проводится в специальных печах Пастера или сухожаровых шкафах, которые представляют собой металлический ящик с двойными стенками, с хорошей асбестовой теплоизоляцией и электрообогревателем (рис. 38). В верхней части шкафа имеется отверстие для термометра и отдушина для выхода горячего воздуха и паров воды. Стерилизуют сухим жаром вату, марлю, пробирки, пастеровские и градуированные пипетки, колбы, чашки Петри и другую стеклянную посуду. Перед стерилизацией посуду хорошо моют, высушивают, закрывают пробирки и колбы ватными пробками, а пипетки завертывают в бумагу. Стерилизация проводится при 160—170°С в течение 1,5 ч с момента достижения этой температуры. Показателем достаточной стерилизации

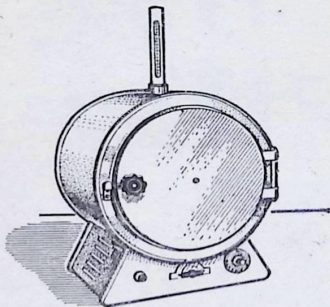


Рис. 38. Печь Пастера

является легкое пожелтение бумаги, в которую завернуты стерилизуемые предметы. Простерилизованную посуду извлекают из печи Пастера только после того, как она остынет, так как вследствие резкой перемены температуры она может лопнуть.

Стерилизация паром под давлением — самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации. Даже однократная стерилизация паром под давлением уничтожает не только вегетативные, но и споровые формы бактерий. Стерилизацию паром под давлением проводят в специальных приборах — автоклавах (рис. 39). Автоклав представляет

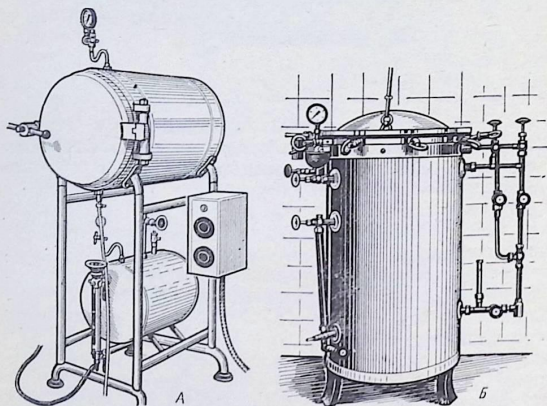


Рис 39. Автоклав горизонтальный АГ-1 (А) и вертикальный (Б)

собой массивный двухстенный котел, окруженный снаружи металлическим кожухом и снабженный массивной откидывающейся крышкой, которая плотно привинчивается к котлу специальными болтами. Между стенками котла имеется свободное пространство, в которое заливается вода и по которому образующийся при кипении пар через отверстия поступает во внутреннюю камеру. В горизонтальных автоклавах имеется два котла — нижний для воды, верхний — для загрузки сте-

рилизуемого материала. Пар из нижнего котла в стерилизационную камеру проходит по соединительной трубе. Автоклав снабжен кранами для выпуска пара, манометром, показывающим давление, и специальным предохранительным клапаном, автоматически поддерживающим заданный режим работы (давление). Работа с автоклавом сопряжена с некоторыми опасностями и должна проводиться при соблюдении определенных правил подготовленными и проинструктированными сотрудниками.

Стерилизация в автоклаве проводится обычно при 1 атм (сверх нормального атмосферного), что соответствует $120,6^{\circ}\text{C}$, или при 1,5 атм, что соответствует 126°C . В отдельных случаях при сильном заспорении материала устойчивыми к температуре формами микроорганизмов стерилизация проводится при повышенном давлении, доходящем до 2 атм, что соответствует $134,18^{\circ}\text{C}$. Продолжительность стерилизации зависит от состава стерилизуемого объекта и степени его бактериального загрязнения и колеблется от 30 мин до 1—1,5 ч.

Стерилизуют в автоклаве питательные среды, лабораторную посуду, перевязочный материал, халаты, хирургические инструменты, отработанные культуры, трупы животных и т. д.

Питательные среды, содержащие углеводы, стерилизуются в автоклаве при пониженном давлении (0,5 атм) и температуре $110\text{—}112^{\circ}\text{C}$ в течение 10—15 мин, отсчитывая время с момента достижения нужного давления. Контролировать температурный режим в автоклаве можно с помощью веществ, имеющих определенную точку плавления. Их помещают в автоклав в пробирках с добавлением краски. К таким веществам относятся бензолафтол (t пл. 110°C), бензойная кислота (t пл. 120°C). Эффективность стерилизации проверяют высевом на питательные среды материала, заведомо зараженного спорами. Материал выдерживают в автоклаве вместе со стерилизуемыми объектами. При автоклавировании паром под давлением погибают не только вегетативные, но и споровые формы микробов.

Стерилизация текучим паром применяется в тех случаях, когда стерилизуемый материал изменяется при температуре выше 100°C . Текучим паром стерилизуют питательные среды, содержащие белки, угле-

воды, молоко, картофель и др. Для стерилизации текущим паром используют автоклав с незакрепленной крышкой и открытым паровыпускным краном или специальный аппарат Коха (рис. 40). Аппарат Коха представляет собой металлический цилиндр, на дно которого наливается вода. Над водой имеется сетка, на которой устанавливается стерилизуемый материал. Сверху аппарат закрывается крышкой с отверстием, через которое пар свободно выходит наружу. Цилиндр с поверхности

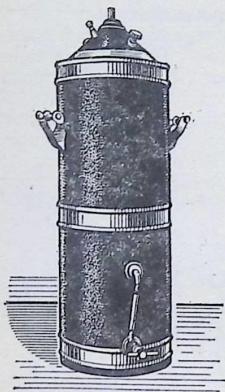


Рис. 40. Аппарат Коха

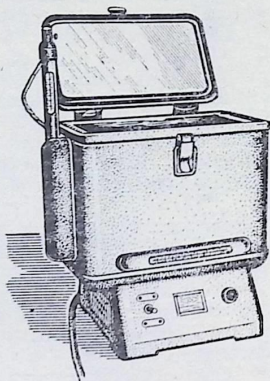


Рис. 41. Водяная баня

покрыт теплоизолирующим материалом. Стерилизация проводится в течение 30 мин — 1 ч с момента закипания воды. При этом погибают только вегетативные формы микробов, а споровые сохраняют свою жизнеспособность. Для уничтожения споровых форм прибегают к повторной стерилизации через сутки, повторяя ее три раза. Это так называемая дробная стерилизация.

Тиндализация — разновидность дробной стерилизации. Она проводится в аппаратах Коха или в специальных водяных банях (рис. 41) с целью уничтожения микроорганизмов в веществах, легко разрушающихся

и денатурирующих при температуре выше 60°C (нативные белки сыворотки крови и яиц, витамины и т. д.). Прогревание проводится в водяных банях или других приборах при температуре $56\text{--}58^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч с 5—6-кратным повторением через каждые 24 ч. В интервалах между прогреваниями материал выдерживается при комнатной температуре. За это время споровые формы микробов прорастают и превращаются в вегетативные, которые погибают при повторных прогревах.

Пастеризация — однократное прогревание материала в течение 30 мин при температуре $65\text{--}70^{\circ}\text{C}$ или 5—10 мин при температуре $75\text{--}80^{\circ}\text{C}$. После прогревания материал быстро охлаждают до 10°C и сохраняют при такой температуре. Этот метод направлен на уничтожение только вегетативных форм, преимущественно патогенных, микробов. Споровые же формы и многие сапрофитные микроорганизмы сохраняются. Применяется этот метод для обеспложивания молока, пива, вин и других продуктов. При пастеризации полностью сохраняются витамины и вкусовые качества продуктов. Пастеризованные продукты длительному хранению не подлежат.

Стерилизация фильтрованием применяется для освобождения от микробов различных жидкостей (питательные среды и др.), которые нельзя подвергать действию высокой температуры. Этим методом механически отделяют бактерии от экзотоксинов, фагов и фильтрующихся форм микробов. Для этого применяют мелкопористые свечи Беркефельда, изготовленные из инфузорной земли, фильтры Шамберлана (рис. 42), изготовленные из каолина, песка и кварца, и пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца (см. рис. 61).

Фильтры Беркефельда и Шамберлана представляют собой небольшие полые цилиндры — свечи с определенным диаметром пор, обозначаемых номерами. Фильтрование ведется под давлением или в вакууме. Для регенерации свечей их кипятят в водопроводной воде, а затем прокалывают в муфельной печи.

Пластинчатые фильтры Зейтца — это круглые асбестовые пластины, вставленные в металлические держатели, состоящие из полого цилиндра (верхняя часть) и опорной части, заканчивающейся воронкообразным тубусом для стока фильтрата. Асбестовую пластинку помещают на сетку воронки и части держателя соеди-

няют винтами. Собранный аппарат монтируют в колбу Бунзена с отводной трубкой и стерилизуют в автоклаве.

Фильтруемую жидкость наливают в стеклянный сосуд и по резиновому шлангу подают в аппарат. Фильтрат собирают в колбу Бунзена, из которой откачивают воздух. Под влиянием разности давлений жидкость про-

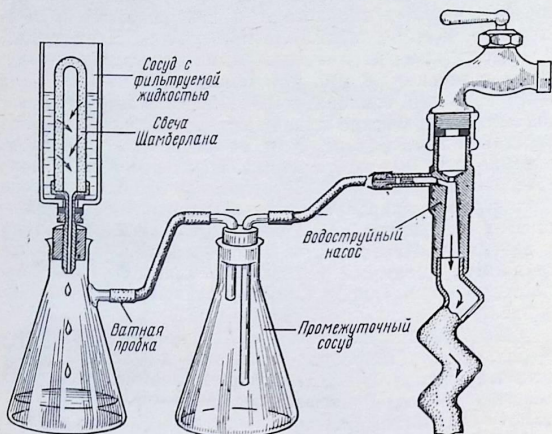


Рис. 42. Фильтровальный прибор со свечой Шамберлана

сасывается через фильтр и скапливается в колбе — приемнике. Асбестовые пластинки используются для фильтрации однократно.

Для некоторых работ вместо асбестовых фильтров Зейтца используют мембранные фильтры, изготовленные из нитроцеллюлозы. Они обозначены номерами в зависимости от диаметра пор (от 350 до 1200 нм). Стерилизуют их кипячением в дистиллированной воде в течение 20 мин.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Автоклав, сушильный шкаф, аппарат Коха, водяная баня, электрический стерилизатор, чашки Петри, пробирки, колбы, пипетки, шприцы, иглы инъекци-

онные, металлические петли, вата, бумага для завертывания стеклянной посуды, сода, питательные среды, свечи Шамберлана и Беркефельда, монтаж фильтра Зейтца.

Задание. 1. Простерилизовать бактериологическую петлю в пламени.

2. Прокипятить в стерилизаторе шприц, иглы и другие инструменты.

3. Завернуть чашки Петри, пипетки и пробирки в бумагу, поместить их в печь Пастера для стерилизации.

4. Подготовить автоклав к работе.

5. Наполнить три пробирки водой по 9 мл и поместить их в автоклав для стерилизации.

6. Профильтровать жидкость через фильтр Зейтца.

Методические указания. Студенты знакомятся с методами и последовательностью работы при стерилизации питательных сред, лабораторной посуды и других материалов в печи Пастера, аппарате Коха и автоклаве. Каждый студент завертывает в бумагу 5 чашек Петри, 5 градуированных и 10 пастеровских пипеток, 10 пробирок и помещает их в печь Пастера для стерилизации. Во избежание склеивания чашек при стерилизации сухим жаром необходимо между ними проложить листочки бумаги. Разливают дистиллированную воду (по 9 мл) по пробиркам и помещают их в автоклав для стерилизации.

Два студента в присутствии группы готовят автоклав к работе: наливают воду, загружают предназначенный для стерилизации материал в камеру, закрывают и закрепляют винтами крышку автоклава, открывают паровыпускной кран, включают обогрев, выпускают воздух, закрывают кран, доводят давление до 1 атм., выдерживают материал при этом давлении 30 мин, выключают обогрев, охлаждают автоклав и извлекают из него простерилизованный материал.

Каждые два студента стерилизуют кипячением шприц, инъекционные иглы, скальпель и фильтруют воду через фильтр Зейтца, смонтированный с вакуумным насосом Комовского.

Дыхание микробов

Все процессы жизнедеятельности микробной клетки сопровождаются тратой энергии и требуют ее возобновления. Как известно, зеленые растения получают энер-

гию от солнца. Большинство же микроорганизмов не содержат хлорофилла и не могут пользоваться солнечной энергией. Они добывают энергию за счет экзотермических биохимических процессов, а именно дыхания, представляющего собой совокупность экзотермических реакций, происходящих в микробной клетке при окислении различных органических и неорганических соединений. В процессе дыхания участвуют специфические ферменты типа дегидрогеназ и оксидаз.

Строго разграничить процессы питания и дыхания у микробов нельзя. Принято, однако, считать, что в процессе питания происходит поглощение энергии (эндотермические реакции), а при дыхании (биологическом окислении) происходит освобождение энергии (экзотермические реакции). Эти два процесса идут параллельно. Освобождающаяся при дыхании энергия используется клетками микроорганизмов на синтетические процессы, процессы роста, размножения, движения и др.

Существуют различные теории, объясняющие механизм окисления веществ в процессе дыхания. В настоящее время все толкования по этому вопросу объединены в одну теорию — биоэнергетическую. Согласно этой теории первичное окисление органических веществ происходит отщеплением водорода и электронов от субстрата при участии специфических ферментов — дегидрогеназ. Отщепившийся водород перемещается по цепи ферментов к акцептору.

Если акцептором водорода является кислород воздуха, то этот процесс называется аэробным дегидрированием или аэробным дыханием; он заканчивается образованием CO_2 и воды и накоплением полезной энергии в виде АТФ и др. Если акцептором водорода является не кислород, а какой-то промежуточный акцептор, например кофермент или продукт метаболизма бактерии, то процесс называется анаэробным дегидрированием или брожением. Освободившийся водород перемещается по цепи ферментов и используется для восстановления или пировиноградной кислоты, или соединений, образованных из нее, или выделяется в газообразном состоянии. При анаэробном дыхании энергия добывается не путем окисления, а путем расщепления органических соединений (чаще всего углеводов) в от-

сутствие свободного кислорода. При этом наряду с выделением энергии микроорганизмы получают и кислород.

Процесс дыхания у бактерий, таким образом, состоит из сопряженных окислительно-восстановительных реакций, при которых одни вещества окисляются, другие восстанавливаются.

По типу дыхания микроорганизмы принято делить на следующие группы.

Облигатные аэробы, жизнедеятельность которых протекает за счет окисления веществ кислородом воздуха.

Облигатные анаэробы получают энергию за счет процессов окисления-восстановления органических веществ питательной среды без участия кислорода воздуха. Они развиваются только в отсутствие кислорода воздуха. Кислород получают при анаэробном расщеплении сложных органических соединений.

Между указанными группами существуют промежуточные группы микроорганизмов — факультативные аэробы и факультативные анаэробы.

Факультативные аэробы могут жить как при доступе кислорода воздуха, так и в его отсутствие. Они могут получать энергию как при окислении веществ кислородом воздуха, так и за счет разложения органических веществ при отсутствии кислорода.

Факультативные анаэробы не нуждаются для своей жизнедеятельности в кислороде воздуха. Они получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций, протекающих в отсутствие кислорода воздуха. Однако они могут развиваться и в присутствии кислорода воздуха.

Следовательно, кислород используют как аэробы, так и анаэробы. Разница состоит в источнике поступления кислорода и в химизме его ассимиляции. Аэробы поглощают кислород из воздуха, анаэробы же получают кислород и энергию при разложении сложных органических соединений в отсутствие свободного кислорода воздуха.

Техника посевов микробов на питательные среды

В естественных условиях микроорганизмы, заселяющие почву, воду, воздух и окружающие нас предметы и субстраты, живут и развиваются в ассоциации с большим количеством различных видов и групп микробов. Для того чтобы определить вид, изучить его морфологические и физиологические особенности и роль представителей данного вида микробов в естественных процессах, необходимо изолировать его из смеси организмов и выделить в чистую культуру.

Чистой культурой в микробиологии называют видимый рост на питательных средах одного вида или штамма микробов, происходящих заведомо из одной споры или из одной клетки.

Вид — это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходное строение и физиологические функции. Культуры микробов одного вида, выделенные из разных источников, называют **штаммами**. Некоторые культуры микробов одного вида могут отличаться друг от друга по одному или нескольким признакам. Такие культуры называют в микробиологии **типами** или **биотипами**. Типы микробов могут различаться, например, по биохимическим признакам, чаще всего по активности ферментов (биохимические или ферментативные типы), по чувствительности к антибиотикам (стрептомициноустойчивый тип), по чувствительности к специфическим фагам (фаготип), по антигенным признакам (серотип) и т. д.

Клон (или клонированная культура) — это культура микробов одного вида или штамма, содержащая генетически однородные клетки. Клоны получают в результате размножения одной клетки, изолированной с помощью микроманипулятора или другими методами.

Видимое невооруженным глазом изолированное скопление микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде в результате размножения одной или нескольких клеток, называют **колонией**.

Основным этапом любого микробиологического исследования является выделение микроорганизмов в чистые культуры из исследуемого материала, содержащего смесь различных микробов.

Материалом для исследования могут быть образцы

почвы, семена, надземные части или корни растений, вода, растительные соки, различные выделения организма животных и человека и т. д. Доставленный в лабораторию материал подвергают бактериологическому исследованию в тот же день.

Жидкий материал для посева берут бактериологической петлей или пипеткой. При взятии петлей жидкость должна образовать в кольце петли тонкую прозрачную пленку. Пипетками пользуются в тех случаях, когда материал засевают в большом или точно отмеряемом объеме. Из плотного материала, который может эмульгироваться, готовят взвесь в физиологическом растворе (0,85%-ный раствор NaCl). В случае посева такого плотного материала, из которого нельзя приготовить взвесь, его растирают в стерильной ступке со стерильным песком или раздробленным стеклом, добавляют физиологический раствор и (после приготовления взвеси) делают посев.

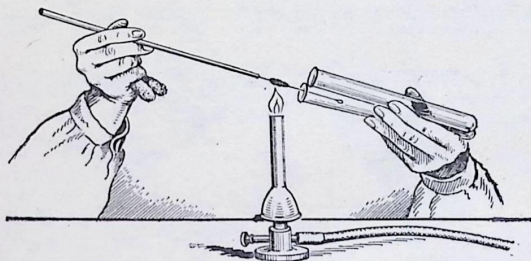


Рис. 43. Посев микробов на жидкую питательную среду в пробирки

Посев в жидкую питательную среду производится бактериологической петлей, пастеровской или градуированной пипеткой. Соблюдая стерильность, петлей берут посевной материал, вносят его в пробирку (рис. 43) с жидкой питательной средой, легко встряхивают петлю в верхнем мениске жидкости или растирают на стенке пробирки, а затем смывают жидкой средой. При посеве пипеткой содержимое выпускают на стенку пробирки у края жидкости или вносят пипетку

в глубь среды и содержащийся в ней материал выдувают. После посева петлю или пипетку извлекают из пробирки и обеззараживают. Пробирку с засеянной культурой обжигают на пламени и быстро закрывают пробкой, проводя ее через пламя так, как бы стремясь втолкнуть в пробирку часть пламени. Засеянные пробирки встряхивают, подписывают и помещают в термостат для проращивания.

Посев на плотные питательные среды. При посеве на косой агар пробирку с культурой и скошенным агаром берут в левую руку так, чтобы скошенная поверхность агара была обращена кверху. Пробки пробирок захватывают мизинцем правой руки и извлекают над пламенем. Прокаленной петлей захватывают материал и при строгом соблюдении стерильности переносят в пробирку со свежей питательной средой. Петлю с культурой опускают до дна пробирки. Прикасаются петлей к питательной среде и скользящими движениями по скошенной поверхности агара наносят прямую линию или зигзагообразные штрихи (рис. 44). Распреде-

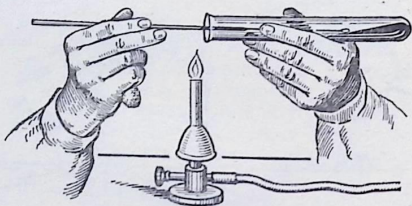


Рис. 44. Посев микробов на скошенный агар

лив материал, петлю вынимают. Край пробирки обжигают в пламени. Пробирку над пламенем закрывают пробкой, подписывают и ставят в штатив. Петлю прокалывают в пламени горелки и ставят в штатив.

Посев на чашку Петри проводят около горелки. Чашку фиксируют на столе левой рукой. Крышку приподнимают большим, средним и указательным пальцами настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходила петля или шпатель. Посевной материал захватывают петлей и штриховыми движениями

распределяют по поверхности питательной среды. Бактериологическую петлю прокалывают на огне непосредственно перед взятием материала и немедленно после посева. Можно нанести каплю посевного материала на поверхность агара петлей или пипеткой, а затем растереть ее стерильным шпателем (рис. 45). Стерильные



Рис. 45. Посев микробов на чашку Петри

пипетки и стеклянные шпатели перед посевом развертывают из бумаги над пламенем горелки, а после посева опускают в дезинфицирующий раствор.

На чашках Петри со стороны дна, а на пробирках в верхней части делают надпись восковым карандашом или тушью, где указывают дату, название засеянного материала или номер анализа, номер рабочего места студента. Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроба. Чашки в термостате размещают вверх дном, что предотвращает стекание конденсационной воды с крышки и размыв колоний.

Посев уколом в столбик питательной среды. Пробирку с питательной средой, застывшей в виде столбика, берут в левую руку. Над пламенем вынимают пробку и пере-

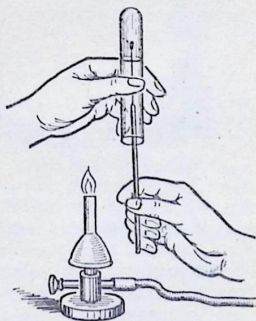


Рис. 46. Посев уколом в агар столбиком

ворачивают пробирку вверх дном. Петлю с исследуемым материалом вкалывают снизу в центр столбика (рис. 46) на всю его глубину, затем петлю извлекают, пробирку закрывают, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

Устройство термостата

Для того чтобы высеянные на питательные среды микробы начали размножаться, необходимо создать им соответствующие температурные условия. Большинство патогенных микробов хорошо размножается при температуре тела животных ($37-38^{\circ}\text{C}$). Для большинства почвенных сапрофитов и фитопатогенных микроорга-

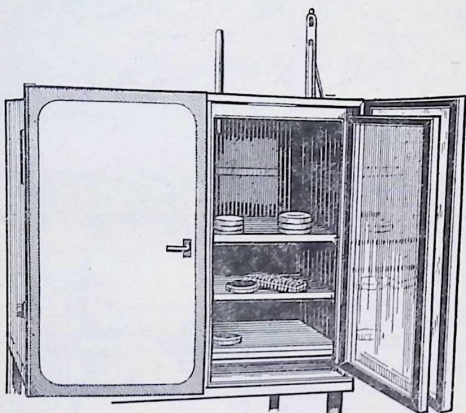


Рис. 47. Термостат

низмов оптимальной является температура $27-32^{\circ}\text{C}$. Необходимая для развития микробов температура создается в специальных приборах — термостатах (рис. 47), куда помещаются чашки или пробирки с посевами.

Термостат представляет собой ящик с двойными стенками, между которыми находится воздух или вода. Наружную стенку термостата делают из дерева, асбес-

та, линолеума и других материалов, плохо проводящих тепло. Внутренняя стенка — металлическая, хорошо проводящая тепло. В верхней стенке термостата имеется отверстие для термометра. Воздух или вода подогревается в термостате с помощью электрообогревателей или иных источников тепла. Необходимый температурный режим регулируется автоматически с помощью специальных терморегуляторов различной конструкции.

Методы выделения чистых культур аэробов

Выделение отдельных видов микробов и получение чистой культуры является основой всей бактериологической работы. При выделении чистых культур микробов из исследуемого материала, содержащего, как правило, смесь разнообразнейших их представителей, используют различные методы, основанные на принципе механического разделения микробов.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп с осветителем, бактериологическая петля, пастеровские пипетки, шпатели стеклянные, предметные и покровные стекла, спички, горелка, мясо-пептонный агар в чашках Петри, косой агар, МПБ в пробирках, исследуемый материал (смесь культур микробов в жидкой среде).

Задание. 1. Произвести посев исследуемого материала:

- а) петлей в жидкую питательную среду;
- б) на 3 чашки Петри по методу Дригальского.

2. Приготовить из исследуемого материала мазок, окрасить его по Граму, просмотреть под иммерсией.

3. Зарисовать форму микробов в альбом.

Методические указания. В качестве исследуемого материала может служить почвенная болтушка. Однако лучше пользоваться смесью 2—3 известных видов микробов в жидкой питательной среде (*E. coli*, *Streptococcus* и *Anthracoïdes*).

Первый день (посев по Дригальскому). Бактериологической петлей или пипеткой берут исследуемый материал и наносят одну каплю на поверхность слегка подсушенного мясо-пептонного агара в чашку Петри. Стеклянным шпателем тщательно втирают каплю в среду по всей площади чашки. Этим же шпателем вти-

рают оставшийся на нем материал в питательную среду во второй, а затем третьей чашке. Шпатель погружают в дезинфицирующий раствор. Посев можно производить и бактериологической петлей. Для этого в верхней части чашки штрихами засевают небольшой участок среды, освобождая таким образом петлю от избытка материала. Затем наносят параллельные или зигзагообразные штрихи по оставшейся части питательной среды. Петлю прожигают в пламени горелки и ставят в штатив. Чашки подписывают, переворачивают дном вверх и помещают в термостат на 18—24 ч. Из исследуемого материала готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Второй день. Вынимают чашки из термостата и изучают характер роста колоний микробов на питательном агаре. При этом обращают внимание на форму, величину, цвет и другие признаки колоний, описанные на с. 108. Отбирают характерные, изолированно расположенные колонии отдельных типов, нумеруют их карандашом со стороны дна чашки и исследуют. Для установления чистоты микробов, растущих в колонии, а также для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств из части отобранной колонии готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Для выделения микробов в чистую культуру отбирают изолированные колонии, содержащие однотипные по морфологии клетки микробов. Из остатка отобранной колонии делают пересев в пробирки со скошенным мясо-пептонным агаром или какой-либо другой питательной средой. Культуру из колонии захватывают петлей, стараясь не задеть окружающих колоний, и штриховыми движениями делают посев на скошенную поверхность агара.

Третий день. Пробирки с посевами вынимают из термостата и отмечают характер роста культуры на косом агаре. Если культура чистая, то по линии посева отмечается однородный сплошной рост бактерий. Если культура оказалась не чистой, то на косом агаре будут расти колонии различных типов. Окончательное заключение о чистоте культуры принимают после просмотра мазка. Для этого из культуры готовят мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют. Если в мазке обнаруживаются однотипные по морфологии и окраске микробные клетки, то культура считается чистой. Эту

культуру подвергают дальнейшей идентификации по биохимическим, биологическим и серологическим свойствам.

Изучение колоний и техника выделения чистых культур микробов

Кроме морфологических признаков очень важное значение при определении вида бактерий имеют их культуральные признаки, т. е. характер роста на жидких и плотных питательных средах. Каждый вид микробов образует на плотных питательных средах колонии (рис. 48), обладающие определенными свойствами. Эти

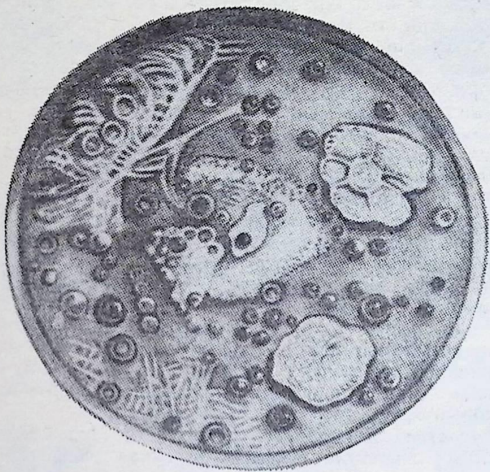


Рис. 48. Колонии бактерий на чашке Петри

свойства колоний изучают макроскопически и микроскопически.

При макроскопическом изучении колоний (невооруженным глазом) чашку просматривают сначала со стороны дна в проходящем свете, а затем со стороны крышки в отраженном свете. Для описания характера

роста бактерий отбирают чашки с отдельно расположенными колониями. Чашки со сплошным ростом микробов или с наличием большого количества слившихся колоний непригодны для исследования.

При наличии в исследуемом материале нескольких видов бактерий на чашках вырастут колонии различных типов, отличающихся между собой по ряду признаков. В этом случае отбирают изолированно расположенные колонии отдельных типов, обводят их со стороны дна восковым карандашом, нумеруют и исследуют.

Характеристику колоний ведут по следующей схеме: величина, форма, прозрачность, цвет, поверхность, рельеф, консистенция.

Величина колонии определяется ее диаметром. Крупные колонии имеют диаметр более 4 мм; средние — от 2 до 4; мелкие — от 1 до 2; карликовые — до 1 мм.

Форма очертаний колоний может быть правильно и неправильно округлая, ризонидная, розеткообразная, неправильная и др. (рис. 49).

Прозрачность колоний определяется степенью прохождения света. Колонии могут быть прозрачными, полупрозрачными и непрозрачными.

Цвет колоний определяется их пигментированностью. Они могут быть бесцветными или пигментированными (белые, желтые, зеленые, красные и др.).

Поверхность колоний может быть гладкая, блестящая (S-форма), шероховатая или морщинистая (R-форма), матовая, сухая, влажная и др.

Рельеф колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикальном разрезе. Колонии могут быть плоские, выпуклые (каплеобразные), с вдавленным центром или двояковыпуклые, погруженные в среду.

Консистенция колоний может быть жидкая, пастообразная, слизистая, кожистая, сухая. Консистенция определяется посредством прикосновения бактериологической петлей к колонии при взятии материала для посева или изготовления мазка.

Микроскопическое изучение колоний проводят или с помощью лупы, или окуляром, вынутым из микроскопа, или непосредственно под микроскопом. При изучении под микроскопом чашку с посевом помещают на предметном столике дном вверх. Исследование ведут при малом увеличении с суженной диафрагмой и несколь-

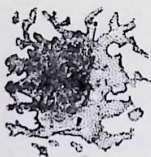


Рис. 49. Форма колоний бактерий

ко опущенным конденсором. При микроскопическом изучении хорошо выявляется строение колоний — характер их краев и структура.

Край колонии может быть ровным в виде четко выраженной линии и неровным (фестончатый, волнистый, зубчатый, бахромчатый, локонообразный).

Структура колоний может быть гомогенная или аморфная, мелко- и грубозернистая, волокнистая, однородная и неоднородная.

При определении культуральных свойств бактерий учитывается также характер их роста на жидких средах и в желатине по уколу. На жидкой питательной среде рост может быть: а) поверхностный — пристеночное кольцо, тонкая, нежная или плотная, сухая, толстая, грубая, морщинистая пленка; б) пристеночный — среда прозрачная, а на стенках сосуда образуются различные наложения (колонии) в виде хлопьев, зерен или нитей; в) придонный — питательная среда прозрачная, а на дне пробирки образуется осадок. Осадок может быть скудным или обильным, гомогенным, крошковатым, зернистым, волокнистым; г) с равномерным помутнением среды.

При посеве уколом в столбик желатины рост может быть только по уколу (стержень) или с образованием боковых выростов от линии укола в виде ершика, елочки, перевернутой вершиной вниз, и т. д. Кроме того, при росте на желатине отмечают степень ее разжижения протеолитическими ферментами микробов. При отсутствии у микроба протеолитического фермента желатина остается плотной. Наличие у микроба протеолитических ферментов определяется различной степенью разжижения желатины (полное разжижение, послойное, в виде воронки).

Выделение и культивирование чистых культур анаэробов

Для культивирования анаэробов необходимо понизить окислительно-восстановительный потенциал (rH_2) среды, создать условия анаэробнозиса, т. е. пониженного содержания кислорода в среде и окружающем ее пространстве. Это достигается применением физических, химических и биологических методов.

Физические методы основаны на выращивании микробов в безвоздушной среде, что достигается:

1. Посевом в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества.

2. Посевом микробов в глубину плотных питательных сред.

3. Механическим удалением воздуха из сосудов, в которых выращиваются анаэробные микроорганизмы.

4. Заменой воздуха в сосудах каким-либо индифферентным газом.

Посев в среды с редуцирующими веществами. В качестве редуцирующих веществ обычно используют кусочки животных или растительных тканей (печень, мозг, почки, селезенка, кровь, картофель, вата). Эти ткани связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии.

Чтобы уменьшить содержание кислорода в питательных средах, их перед засевом кипятят 10—15 мин, а затем быстро охлаждают и заливают сверху небольшим количеством стерильного вазелинового масла. В качестве легко окисляемых веществ используют глюкозу, лактозу и муравьинокислый натрий.

Лучшей жидкой питательной средой с редуцирующими веществами является среда Китт-Тароцци. Она содержит концентрированный мясо-пептонный бульон, 0,5—1% глюкозы, 0,15% агара и кусочки свежесваренных тканей животных (печень). Сверху среду заливают вазелиновым маслом. Эта среда используется с успехом для накопления анаэробов при первичном посеве из исследуемого материала и для поддержания роста выделенной чистой культуры анаэробов.

Посев микробов в глубину плотных сред производится по способу Виньяла-Вейона и Вейнберга.

Способ Виньяла-Вейона состоит в механической защите посевов от кислорода воздуха. Берут стеклянную трубку длиной 30 см и шириной 3—6 мм. Один конец трубки вытягивают в капилляр в виде пастеровской пипетки, а у другого делают перетяжку. В оставшийся широкий конец трубки вставляют ватную пробку. В пробирки с расплавленным и охлажденным до 50° С агаром засевают исследуемый материал. Затем насасывают агар в стерильные вейоновские трубки. Капиллярный конец

трубки запаивают на пламени и трубки помещают в термостат.

Выращивание в таких трубках надежно защищает среду от атмосферного воздуха. Создаются благоприятные условия для роста даже самых строгих анаэробов (*Bac. oedematiens*, *Bac. tetani* и др.). Для выделения изолированной культуры трубку надрезают на уровне колонии напильником, ломают, а колонию захватывают стерильной петлей и переносят в пробирку с питательной средой для дальнейшего выращивания и изучения в чистом виде.

Способ Вейнберга. Запаиваемым концом пастеровской пипетки переносят материал из первичного посева (среда Китт-Тароцци) или исследуемого материала в три пробирки со стерильным физиологическим раствором. Затем пипетку переносят в расплавленный и охлажденный до 45—50°С сахарный агар, разлитый высоким столбиком в узкие пробирки или трубки Виньяла.

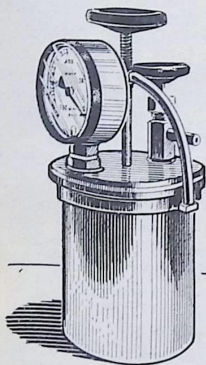


Рис. 50. Анаэростат

Обычно берут несколько пробирок (чаще всего три) и делают ряд последовательных разведений, перенося пипетку из одной пробирки в другую. Засеянные пробирки быстро охлаждают холодной водой и помещают в термостат. На следующий день изучают форму и другие призна-

ки выросших колоний и отбирают колонии для пересева на среду Китт-Тароцци.

Описание характера роста колоний анаэробов производится при просмотре пробирок под лупой в проходящем свете от осветителя или под малым увеличением микроскопа.

Удаление воздуха (а следовательно, и кислорода) производится путем механического откачивания его из специальных приборов — анаэростатов (рис. 50),

в которые помещают чашки с посевом анаэробных микробов.

Анаэростат представляет собой толстостенный металлический цилиндр с хорошо притертой крышкой (с резиновой прокладкой), снабженный отводящим краном и вакуумметром. Внутри цилиндра находится этажерка или ведро для размещения чашек Петри и пробирок с посевами. После размещения чашек воздух из анаэростата удаляют при помощи вакуумного насоса (ручного или электрического). Отрицательное давление обычно доводят до 0,5—0,8 атм, после чего кран перекрывают специальным винтом, затем анаэростат разъединяют с вакуумным насосом и переносят в термостат с температурой 37°С. При отсутствии анаэростата можно пользоваться химическими вакуумными эксикаторами.

Способ Цейслера. Каплю материала со среды Китт-Тароцци помещают на середину чашки с кровавым сахарным агаром и распределяют по поверхности стерильным шпателем. Этим же шпателем без его стерилизации делают посев еще на две чашки (по Дригальскому). Чашки с посевом помещают в анаэростат, из которого удаляют воздух механическим путем. После выращивания в термостате производят описание выросших колоний и пересев на среду Китт-Тароцци.

Замена воздуха индифферентным газом (азотом, водородом, углекислым газом и др.) может производиться в тех же анаэростатах и эксикаторах многократным вытеснением его газом из баллона или газовой сети.

Химические методы основаны на поглощении кислорода воздуха в герметически закрытом сосуде (анаэростат, эксикатор, аппарат Омелянского) в процессе химической реакции между пирогаллолом и едкой щелочью или между углекислым натрием и гидросульфитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Метод Аристовского. В две крышки от чашек Петри насыпают порошок углекислой соды, на поверхность которой насыпают 1,5 г гидросульфита натрия или 7,5 г пирогаллола. Порошок увлажняют водой и перемешивают. Одну крышку со смесью помещают на дно анаэростата или эксикатора и ставят на нее чашки с посевами. Другую крышку со смесью ставят поверх засеянных чашек. Анаэростат закрывают крышкой и помещают в термостат. В результате химического взаимо-

действия гидросульфита или пирогаллола со щелочью происходит связывание кислорода воздуха и создаются в анаэроостате условия анаэробноза.

Метод Перетца. Берут три чашки Петри, на дне которых на стеклянных палочках или спичках (без серы) размещают предметные стекла или стеклянные пластинки размером 6×6 см; чашки стерилизуют. Запаянную пастеровскую пипетку погружают в исследуемый материал и переносят в пробирку с 10 мл стерильного физиологического раствора. Сделав 2—3 вращательных движения, пипетку переносят последовательно еще в две пробирки с физиологическим раствором. После этого пипетку с оставшимися на ее поверхности микробами переносят последовательно в три пробирки с 20 мл прокипяченного и охлажденного до 50—45°С МПА с 10% глюкозы. В каждую пробирку с агаром добавляют 2—4 капли 10%-ного раствора гидросульфита натрия на 10%-ном растворе углекислой соды, или 0,1 мл 8%-ного раствора аскорбиновой кислоты на 10%-ном растворе углекислой соды. Содержимое пробирок быстро перемешивают и выливают в стерильные чашки таким образом, чтобы агар заполнил пространство между стеклянной пластинкой и дном чашки. Затем чашки помещают в термостат. В результате химического поглощения кислорода из среды и невозможности его диффузии через стеклянную пластинку под ней создаются условия для роста изолированных колоний анаэробов.

Биологический метод. Он основан на совместном выращивании в одной чашке анаэробов с жадно поглощающими кислород аэробами.

Метод Фортнера. Для этой цели используют или специальные чашки Петри, дно которых разделено невысоким валиком из стекла на две части, или обыкновенные чашки Петри. В последнем случае из застывшей агаровой пластинки по диаметру чашки вырезают стерильным скальпелем полоску агара шириной в 1 см. Получается два агаровых полудиска в одной чашке. На одну (обычно большую) сторону агаровой пластинки засевают микробов, жадно использующих кислород, т. е. аэробов. Чаще всего для этой цели используют *Bac. prodigiosum*, *Staphylococcus aureus*. На другую половину диска сахарного агара высевают анаэроб или исследуемый материал и чашку закрывают крышкой.

Края чашки заклеивают лейкопластырем, пластилином или заливают расплавленным парафином и помещают в термостат с необходимой температурой. При наличии подходящих условий в чашке начнут размножаться аэробные микроорганизмы. После того как весь кислород в герметически закрытой чашке будет использован аэробами, начинается рост анаэробных бактерий (на 3—4-е сутки).

При культивировании (по Фортнеру) применяют кровяной агар (5—7% крови) с 1—2% глюкозы. В целях сокращения воздушного пространства в чашке питательную среду наливают возможно большим слоем.

Комбинированный метод основан на сочетании физических, химических и биологических методов создания анаэробноза.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп с осветителем, набор красок, петля, пастеровские пипетки, пирогаллол, гидросульфит натрия, углекислый натрий, 50%-ный раствор едкой щелочи, крышки от чашек Петри, анаэроостат или вакуумный эксикатор, вакуумный насос, пробирки со стерильной средой Китт-Тароцци (по одной на каждого студента), чашки с кровяным сахарным агаром (одну на студента), пробирки со стерильным физраствором (по 3 шт.), пробирки с расплавленным сахарным агаром высоким столбиком (по 3 шт.), исследуемый материал, чашки с ростом изолированных аэробных микроорганизмов от предыдущего занятия, пробирки с косым МПА (по 1 шт.).

Для демонстрации: пробирки с ростом анаэробов на среде Китт-Тароцци и по Вейнбергу, чашки с ростом анаэробов в посевах по Цейсселеру, по Перетцу, по Фортнеру, чашка с ростом изолированных колоний аэробов.

Задание. 1. Описать характер роста аэробов в посевах предыдущего занятия.

2. Отобрать изолированные колонии и произвести посев на косой агар для выделения чистой культуры.

3. Из остатка отработанной колонии приготовить мазок, окрасить его по Граму и просмотреть под иммерсией.

4. Произвести посев исследуемого материала для выделения анаэробов:

- а) на среду Китт-Тароцци;
- б) в агар столбиком по Вейнбергу;
- в) на кровяной сахарный агар по Цейсселеру (демонстрация).

Методические указания. Каждый студент просматри-

вает чашки с ростом аэробов в посевах предыдущего занятия. Отбирает чашки с ростом изолированных колоний и дает характеристику выросших колоний по схеме. Отбирает отдельные колонии для дальнейшего исследования и отмечает их карандашом со стороны дна. Из отобранных колоний делает пересев на косой агар с помощью бактериологической петли для выделения чистой культуры. Из остатка отобранной для посева колонии готовят мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют под иммерсией, отмечая при этом чистоту культуры и морфологию микроба.

При выделении анаэробов на среду Китт-Тароцци посев производят пастеровской пипеткой. Для этого пробирки с исследуемым материалом и стерильной средой берут в левую руку, открывают их над пламенем горелки и набирают в пипетку исследуемый материал. Пробирку со средой наклоняют так, чтобы вазелиновое масло всплыло вверх в одну сторону. В освободившуюся от масла поверхность среды вносят пипетку с материалом и выдувают несколько капель. Пипетку извлекают из пробирки и закрывают ее пробкой. Посев подписывают и помещают в термостат.

При посеве анаэробов методом Вейнберга исследуемый материал захватывают пастеровской пипеткой с запаянным концом капилляра. Пипетку с материалом споласкивают трижды в пробирках со стерильным физиологическим раствором, а затем проводят последовательно через три пробирки с сахарным агаром, прокипяченным перед посевом и быстро охлажденным до 50—45° С. Споласкивание пипетки и посев производятся над пламенем горелки с соблюдением стерильности.

При посеве по методу Цейссlera наносят каплю исследуемого материала на середину чашки Петри бактериологической петлей или пастеровской пипеткой. Каплю втирают в поверхность агара стерильным шпателем. Шпатель вынимают из первой чашки и без стерилизации переносят во вторую. Круговыми движениями втирают оставшийся на шпателе материал в поверхность среды и переносят его в третью чашку для посева. Засеянные чашки помещают в анаэроостат, герметически закрывают его и подключают к вакуумному насосу. Выдерживают анаэроостат под вакуумом до получения отрицательного давления в 0,5—0,8 атм, перекрывают

кран, разъединяют с насосом и помещают в термостат с соответствующей температурой.

Выделение анаэробов производят по следующей схеме.

Первый день. Исследуемый материал петлей или пипеткой вносят в пробирку со средой Китт-Тароцци. Для удаления растворенного кислорода среду перед посевом прогревают в течение 15—20 мин в кипящей водяной бане. После посева среду вновь прогревают на водяной бане в течение 15—20 мин для уничтожения неспоровых форм бактерий. Пробирки с посевами помещают в термостат на 24—48 ч.

Второй день. Просматривают посевы. При росте анаэробов в среде Китт-Тароцци наступает помутнение и появляется придонный осадок. В приготовленных мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают вегетативные и спорозоносные бактерии. Для выделения чистой культуры производят посев со среды Китт-Тароцци на сахарный агар по Вейнбергу или на кровяной сахарный агар по Цейсслеру.

Третий день. Выросшие на сахарном агаре в пробирках или на чашках колонии изучают с помощью лупы или под малым увеличением микроскопа. Для выделения чистых культур отбирают характерные колонии. На месте отобранной колонии надпиливают и переламывают пробирку или трубку Вейона. Колонию из среды отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в пробирку со средой Китт-Тароцци, которую помещают в термостат. Из остатка колонии готовят мазок, красят его по Граму и исследуют.

Четвертый день. Проверяют характер роста и чистоту культуры на среде Китт-Тароцци, производят посевы на среды для идентификации анаэробов по биохимическим свойствам. Производят дальнейшую идентификацию микробов по биохимическим свойствам. Производят серологическую идентификацию микробов с иммунными сыворотками.

Идентификация выделенных культур

Идентификацию выделенных культур проводят путем изучения морфологии бактерий, их тинкториальных свойств, культуральных, биохимических, серологических и других признаков.

Изучение культуральных признаков производят по

схеме, описанной на с. 108. Изучение биохимических признаков проводят путем определения ферментативной активности бактерий на специальных питательных средах.

Изучение ферментов микробов

Необычно многообразная деятельность, которую развивают микроорганизмы в процессе превращения веществ в природе, обусловлена наличием у них сложных и активных ферментов, или энзимов. Ферменты синтезируются живыми клетками. После гибели клеток ферменты долгое время могут оставаться в активном состоянии.

Некоторые ферменты выделяются за пределы бактериальной клетки в процессе ее жизнедеятельности (экзоферменты), а большинство энзимов тесно связано со структурными образованиями цитоплазмы и могут быть выделены из нее только после разрушения клетки (эндоферменты).

Ферменты — это белки, выполняющие функцию биокатализаторов. Основные свойства ферментных белков заключаются в способности распознавать определенный метаболит и катализировать его превращения, а также в способности подчиняться воздействиям, регулирующим каталитическую активность. Катализируемая ферментом реакция начинается со связывания метаболита, т. е. субстрата, с ферментным белком. Каждый фермент взаимодействует, как правило, с одним метаболитом — своим субстратом — и катализирует его превращение в другой метаболит до установления равновесия, т. е. каждый фермент характеризуется определенной субстратной специфичностью.

Кроме того, каждый фермент катализирует лишь одно из многих различных превращений, которым может подвергаться данный метаболит, т. е. обладает определенной специфичностью действия. Распознавание субстрата ферментом происходит в процессе связывания. Связывание осуществляется в совершенно определенном участке молекулы фермента, так называемом каталитическом центре. Механизм действия ферментов включает образование промежуточных фермент-субстратных комплексов, обусловленное молекулярным соответствием между субстратом и активным

центром фермента. Субстрат и фермент подходят друг к другу, как ключ к замку. Характерная особенность ферментов — их способность катализировать химические реакции за счет снижения энергии активации, когда химическое превращение метаболита на ферменте становится возможным при обычной температуре и давлении.

Крайне важным свойством ферментов является изменчивость их каталитической активности под влиянием регуляторных (аллостерических) центров. Оказывается, у ферментов имеется второй центр связывания — регуляторный (аллостерический) центр. Активность этого центра определяется стационарной концентрацией конечного продукта. Конечные продукты, активируя регуляторный центр, оказывают ингибирующее действие на каталитический центр, снижая активность фермента. Таким образом, концентрации метаболитов, действующих как отрицательные или положительные эффекторы (модуляторы), определяют активность ферментов, а тем самым и скорость соответствующих превращений. Благодаря этому осуществляется контроль и интеграция активности мультиферментных систем. Как правило, конечный продукт ингибирует самый первый из ферментов, катализирующих данную последовательность реакций. Однако известны случаи, когда регуляторный центр оказывается в точке разветвления мультиферментной системы.

По своему химическому составу ферменты разделяются на простые, или однокомпонентные, и сложные, или двухкомпонентные. Простые ферменты — это белки (уреаза, пепсин и др.). Активность их зависит в основном от последовательности расположения аминокислот в молекуле белка. Сложные (двухкомпонентные) ферменты содержат кроме белкового коллоидного носителя (апофермент) некоторые низкомолекулярные соединения, так называемые коферменты или простетические группы. Коферменты служат промежуточными переносчиками электронов или отдельных фрагментов субстрата, например атомов водорода, аминогрупп, метильных или ацетильных групп от одного субстрата к другому.

Простетическая группа обычно содержит металлы (Fe, Cu, Co, Zn, Mo и др.) или витамины. Она непосредственно участвует в химической реакции. Коллоид-

ный же белковый носитель только увеличивает активность фермента и определяет специфичность его действия. Каталитическое действие оказывает только фермент в целом (холофермент); ни кофермент, ни белковая часть в отдельности не активны.

Из химических соединений, входящих в коферменты, наиболее важное значение имеют гемин, тиамин, флавин, аденин, пиридин. Но эти соединения в коферменте должны находиться в нуклеотидной форме, т. е. соединены с азотистым основанием, рибозой и фосфорной кислотой. В этой форме происходит взаимодействие между коферментом и специфическим белком. Так, в состав анаэробных дегидрогеназ входит никотинамид-адениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Действующим началом в них является никотиновая кислота (витамин группы В). В аэробной дегидрогеназе коферментом является флавинадениннуклеотид (ФАД), содержащий в качестве активного центра рибофлавин (витамин В₂).

Процессы, связанные с затратой энергии, могут осуществляться в бактериальной клетке благодаря аденозинтрифосфату (АТФ). Это соединение представляет собой универсальный переносчик химической энергии между реакциями, дающими и потребляющими энергию. В составе аденозинтрифосфата имеются две энергетически богатые связи (макроэргические фосфатные связи, обозначенные символом ~), каждая из которых содержит по 42—63 кДж (10—16 тыс. калорий). Отщепление концевой фосфата сопровождается выделением 29,4—50,4 кДж (7—12 тыс. калорий) вместо 8,4—12,6 кДж (2—3 тыс. калорий), выделяемых при разрыве обычных эфирных связей. При гидролитическом расщеплении макроэргических связей энергия освобождается и может быть использована для синтеза сложных органических соединений в клетке.

Современная классификация и нумерация (индексация) ферментов и их номенклатура исходят из химической природы субстрата и типа катализируемой реакции. На основе этих признаков ферменты делятся на шесть главных классов.

Оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции и принимают участие в клеточном дыхании. Оксидоредуктазы разделяются на подклассы соответственно природе подвергающейся окислению группы в молекуле донора (спиртовая, карбо-

нильная, аминогруппа и пр.). К ним относятся оксидазы, дегидрогеназы, пероксидаза и каталаза.

Гидролазы — катализируют реакции расщепления внутримолекулярных связей гидролитическим путем, т. е. присоединением элементов воды ($H^+—OH^-$).

Они подразделяются по типу гидролизующих связей (эфирные — эстеразы; гликозидные — гликозидазы; амидные — протеазы, амидазы и др.).

Трансферазы — катализируют реакции межмолекулярного переноса различных химических групп и остатков. Они разделяются на подклассы согласно природе переносимых остатков (одноуглеродные остатки, альдегидные, ацильные, азотистые, фосфор- или серосодержащие группы и др.). К ним относятся: метилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфор- и сульфидтрансферазы и др.

Лиазы — катализируют реакции присоединения или отрыва групп по двойным связям. Разделяются согласно природе подвергающейся разрыву связи ($C—C$ — карбоксилиазы, $C—O$ — гидролиазы, $C—N$ — аминолиазы, $S—N$ — десульфоллазы и др.).

Изомеразы — катализируют реакции изомеризации, т. е. внутримолекулярных перемещений групп. К ним относятся рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты, оксикислоты, углеводы и их производные; цис-транс-изомеразы и др.

Лигазы (синтетазы) — катализируют реакции соединения двух молекул, сопряженные с расщеплением пиррофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного нуклеотидтрифосфата. Они разделяются на подклассы по природе вновь образуемых связей ($C—C$, $C—O$, $C—S$, $C—N$ и др.).

Ферменты играют большую роль в процессах расщепления и синтеза различных химических веществ, необходимых для жизнедеятельности клетки. Они являются обязательными участниками всех биохимических реакций, лежащих в основе функций питания и дыхания.

Для обнаружения ферментов исследуемую культуру микробов засевают по общепринятой методике на специальные дифференциально-диагностические среды. В состав сред обязательно должны входить вещества, в отношении которых микробы способны проявлять свою ферментативную активность, например отдельные

углеводы — при определении сахаролитических ферментов, белковое вещество желатин — при обнаружении протеолитического фермента желатиназы и т. д. В состав некоторых сред вводят индикатор, изменяющий цвет среды при изменении ее рН.

Сахаролитическая способность микробов определяется по ферментативному расщеплению многоатомных спиртов и некоторых углеводов, именуемых «сахарами», на альдегиды, кислоты и газообразные продукты (CO_2 ; CH_4 и H_2).

Характерно, что различные виды и даже разновидности микробов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Так, одни бактерии, расщепляя, например, лактозу, совершенно не ферментируют глюкозу и другие сахара. Другие, наоборот, расщепляют глюкозу и не используют лактозу и др.

Для определения способности микроорганизмов расщеплять «сахара» используют специальные дифференциально-диагностические жидкие, полужидкие и плотные питательные среды с соответствующими углеводами и индикатором. Набор жидких или полужидких сред с углеводами и индикатором называют средами Гисса или «пестрым» рядом. Название «пестрый» ряд обусловлено тем, что под действием ферментов растущего микроба использованные сахара расщепляются до продуктов промежуточного распада (кислота). В результате накопления кислоты снижается рН среды, изменяется цвет индикатора и среды. При отсутствии у микробов какого-либо фермента другие углеводы не расщепляются, рН остается неизменным, индикатор остается в восстановительной форме, цвет среды не изменяется.

При разложении углевода до кислоты и газообразных продуктов наряду с изменением цвета среды появляется пузырек газа в поплавке (рис. 51).

Накопление кислоты в среде обозначается буквой К, а газообразование — буквой Г.

Для выделения чистых культур и их дифференциации по сахаролитическим свойствам производят посев бактерий на плотные питательные среды Эндо, Левина и Плоскирева, содержащие лактозу и красители.

Протеолитическая способность микробов. Некоторые микроорганизмы продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты — протеазы, катализирующие расщепление белков. В результате расщеп-

ления молекулы белка образуются продукты промежуточного (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или конечного распада белка (индол, сероводород, аммиак и др.).

Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок. Чаще всего для этой цели применяют мясо-пептонный желатин, свернутую лошадиную сыворотку, коагулированный яичный белок, молоко, пептонную воду и др. Для обнаружения индола, сероводорода и аммиака используют мясо-пептонный бульон Хоттингера.

Протеолитическая активность микроба на желатине определяется по разжижению столбика желатина под действием фермента желатиназы. При регистрации результатов учитывают интенсивность роста и форму разжижения желатиновой среды. Разжижение желатина разными видами микробов различно. Оно может быть послойное, идущее горизонтально сверху вниз, воронкообразное, по

линии укола или в виде слочки, перевернутой вершиной вниз. Штаммы, обладающие высокой активностью фермента желатиназы, разжижают весь столбик желатина, находящийся в пробирке.

При росте в молоке микробы, выделяющие протеолитические ферменты (некоторые виды кокков, ботулинус и др.), через несколько дней вызывают пептонизацию молока. Пептонизация сопровождается растворением сгустка казеина под действием фермента казеиназы, выпадением осадка и просветлением молочной сыворотки.

Индолообразование определяется по способ-

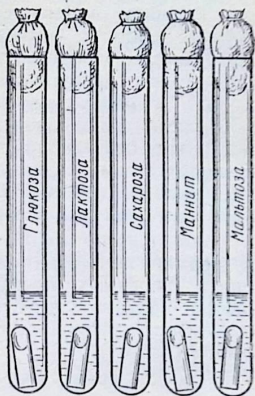


Рис. 51. Ферментация углеводов

ности микроба расщеплять сложную гетероциклическую аминокислоту триптофан под действием фермента триптофаназы. Индол обнаруживают с помощью реактива Эрлиха в 2—3-суточных бульонных культурах или с помощью фильтровальных бумаг, пропитанных насыщенным водным раствором щавелевой кислоты. В присутствии индола щавелевая кислота краснеет.

При расщеплении микроорганизмами белков, в состав которых входят серосодержащие аминокислоты (цистин, цистеин, метионин), образуется H_2S . Сероводород может образовываться и в результате восстановления солей серной, сернистой и серноватистой кислот.

Для определения образования сероводорода пользуются фильтровальной бумагой, пропитанной насыщенным водным раствором уксуснокислого свинца. В присутствии сероводорода уксуснокислый свинец переходит в сернистый свинец, имеющий черный цвет, и бумажка чернеет.

Аммонификация белковых веществ под влиянием ферментов микроорганизмов сопровождается выделением конечных продуктов расщепления — аммиака. Аммиак обладает щелочной реакцией. Его присутствие определяется изменением цвета красной лакмусовой бумаги (синее).

Процесс ферментативного расщепления белка и образование конечных продуктов его распада происходит медленно. Поэтому окончательный учет результатов на образование индола, сероводорода и аммиака производят на 5—7-е сутки после посева.

Окислительно-восстановительные ферменты. Процесс окисления питательных веществ в среде микроорганизмами осуществляется посредством присоединения к ним кислорода с участием ферментов оксидаз или отщеплением от них водорода под влиянием дегидраз. Причем окисление одного органического вещества всегда сопровождается редукцией (восстановлением) другого. Вещество, от которого отщепляется водород, называется донатором, а вещество, к которому присоединяется водород, — акцептором.

При аэробном типе дыхания акцептором водорода является кислород. При анаэробном же типе дыхания

акцептором водорода служат органические соединения, способные легко восстанавливаться и окисляться.

Для выявления редуцирующих свойств микробов используют вещества, изменяющие свой цвет в процессе восстановления. Наиболее пригодными для этой цели являются метиленовый синий, нейтральрот, лакмус, индигокармин, малахитовая зелень и др. Эти вещества добавляют к мясо-пептонному бульону, мясо-пептонному агару, молоку и другим средам, на которые производят посев исследуемых микробов.

Для определения редуцирующей способности бактерий чаще всего применяют следующие методы и питательные среды.

Среда Омелянского. К 100 мл слабощелочного мясо-пептонного агара добавляют 10 капель стерильного свежеприготовленного 1%-ного водного раствора метиленового синего. Среда имеет голубой цвет. Среду засевают исследуемой культурой. При росте бактерий, обладающих редуцирующей способностью, среда обесцвечивается или желтеет.

Молоко с метиленовым синим. К 100 мл обезжиренного прокипяченного молока с рН 7,2 добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора метиленового синего. Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют текучим паром три дня подряд по 30 мин. Среда имеет интенсивно голубой цвет. Среду засевают исследуемой культурой и помещают в термостат на 24 ч.

Редукция метиленового синего проявляется обесцвечиванием молока или изменением голубого цвета на кремовый.

Среда Ротберга. К 100 мл расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 0,3 г глюкозы и 1 мл насыщенного водного раствора краски — нейтральрот. Среду разливают по пробиркам и стерилизуют дробно три дня подряд. Охлаждают пробирки в вертикальном положении. Посев производят уколом на глубину всей среды. При росте микроорганизмов, обладающих редуцирующей способностью, среда желтеет. При газообразовании вследствие разложения глюкозы под действием микробных ферментов в агаре появляются трещины.

Выраженными редуцирующими свойствами обладают молочнокислый стрептококк (*Strep. lactis*), кишечная палочка (*E. coli*), денитрифицирующие бактерии (*Bac. denitrificans*) и ряд других видов.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Штатив с набором сред Гисса с индикатором Андреде, МПБ, молоко простое и с лакмусом, чашки со средой Эндо, Левина и Плоскирева, пробирка с косым агаром, бактериологическая петля, пастеровские пипетки, шпатели, полоски фильтровальной бумаги, пропитанные щавелевой кислотой (для индола) и раствором уксуснокислого свинца (для сероводорода), красная лакмусовая бумага (для аммиака), микроскоп, краски, лупы, культуры бактерий, косяк с ростом чистой культуры аэробных бактерий, среда Китт-Тароцци и агар столбиком с ростом анаэробов.

Задание. 1. Проверить чистоту выделенной культуры аэробов по характеру роста на косом агаре и в мазке, окрашенном по Граму.

2. Описать характер роста анаэробов в среде Китт-Тароцци и в агаре столбиком.

3. Произвести посев чистой культуры аэробов с косого агара на развернутый пестрый ряд для определения сахаролитических, протеолитических и редуцирующих свойств.

Методические указания. При просмотре посевов культуры на косом агаре отмечают характер роста аэробов: сплошной рост или по линии посева, обильный или скудный, однородный или имеются колонии, различающиеся по величине, цвету, прозрачности и другим признакам. Если имеется рост однородных колоний, не отличающихся своими признаками друг от друга, то предполагают, что в пробирке растет чистая культура аэробов. Окончательное заключение о чистоте выделенной культуры аэробов делают после просмотра мазка, приготовленного из этой культуры, окрашенного по Граму. В мазке должны быть однотипные, одинаково окрашенные бактерии.

При описании характера роста анаэробов на среде Китт-Тароцци отмечают наличие или отсутствие помутнения среды, осадка и газообразования в ней.

В агаре столбиком отмечают величину, форму и структуру выросших колоний.

Для определения ферментативных свойств микробов каждый студент делает посев выделенной культуры на среды Гисса с индикатором Андреде, МПБ, МПЖ, молоко и молоко с лакмусом, скошенный и полужидкий агар. Пробирки с набором сред размещают в штативе в один ряд. На каждой пробирке со средами Гисса

надписывают начальную букву названия углевода, содержащегося в среде.

Все пробирки с жидкими и плотными средами засевают исследуемой культурой по общепринятой методике. Культуру захватывают в небольшом количестве на кончик бактериологической петли и вносят в пробирку с соответствующей средой. После посева в одну пробирку петлю обязательно прожигают в пламени горелки, а испытуемую культуру берут заново. Этим предотвращается перенос сахара из одной пробирки в другую, что в конечном счете обеспечивает получение правильных результатов.

Для определения протеолитических ферментов, способных разлагать белковые вещества с образованием индола, сероводорода и аммиака, производят посев исследуемой культуры на МПБ. После посева в пробирку вносят и фиксируют пробкой индикаторные бумажки, пропитанные раствором щавелевой кислоты (на индол), уксуснокислого свинца (на сероводород) и бумажку красного лакмуса (на аммиак). Индикаторные бумажки помещают в пробирку и прижимают пробкой так, чтобы они находились над поверхностью питательной среды, но не касались ее. При наличии у микроба ферментов, расщепляющих белки с образованием указанных газообразных продуктов, через 2—3 дня нижняя часть индикаторных бумажек изменяет свой цвет (чернеет, синее или розовеет). К числу индолообразующих микробов относятся кишечная палочка (*E. coli*), протей (*Proteus vulgaris*), сенная палочка (*Bac. subtilis*). Энергично образуют сероводород десульфифицирующие бактерии (*Spirillum gesulfuricans*), спорогенная палочка (*Cl. sporogenes*) и др. Активно разлагают белки с образованием аммиака аммонифицирующие (*Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*) и денитрифицирующие (*Bac. denitrificans*, *Bac. fluorescens*) бактерии и др.

Изменчивость микроорганизмов

Изменения свойств и функций микроорганизмов под влиянием условий внешней среды могут иметь временный характер, а могут прочно закрепляться и передаваться по наследству. Легко обратимые, не связанные с известными генетическими механизмами изменения называют модификацией. Она может проявляться

в изменении морфологии клеток микроорганизмов и колоний при росте на плотных питательных средах, а также биохимических, ферментативных, антигенных, вирулентных и других свойств микробов. Как правило, фенотипические преходящие изменения исчезают сразу же или вскоре после того, как воздействие вызвавших их внешних факторов прекратилось.

Передающиеся из поколения в поколение потомству наследственные изменения появляются в результате изменений генетического материала (генома) или генетических механизмов микробной клетки. Такие изменения называются **генотипическими**.

В настоящее время имеются убедительные данные о том, что генетическим материалом бактерий, как и других организмов, являются нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК. ДНК является первичным генетическим материалом, из которого построены непосредственно хромосомы и гены, а также бактериальные плазмиды и многие вирусы. Она локализуется в ядерной зоне бактерий, где часто прикрепляется к мезосоме, а также в цитоплазме, если бактерии несут плазмиды. В последнем случае эта ДНК является внехромосомной, плазмидной.

РНК является вторичным генетическим материалом и принимает участие в передаче (в транскрипции и трансляции) генетической информации. Участие РНК в различных этапах передачи генетической информации определяется тем, что существуют различные типы этой нуклеиновой кислоты: информационная, или матричная (мРНК), транспортная (тРНК) и рибосомная (рРНК). В бактериальной клетке РНК находится почти полностью в цитоплазме. Только мРНК обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядре. У некоторых бактериальных вирусов, у отдельных вирусов животных, а также у вирусов растений РНК выполняет функцию первичного генетического материала.

Молекулы ДНК бактерий представляют собой скрученную в правостороннем направлении двойную спираль полимеров, составленных из мономеров, называемых нуклеотидами. Каждый моонуклеотид содержит одно из азотистых оснований — аденин, гуанин, цитозин или тимин, а также по одной молекуле сахара пентозы и фосфорной кислоты. Генетическая информация «записана» в ДНК в виде определенной последовательности четырех

оснований, или нуклеотидов, чередующихся в полинуклеотидной цепи, т. е. генетическая информация в хромосоме имеет линейное расположение. Таким образом, основной генетической единицей является конкретная химическая молекула — нуклеотид. Участок ДНК, ограниченный определенной уникальной последовательностью сотен и тысяч нуклеотидов, несущий в клетке какую-либо точную информацию и являющийся единицей физиологического действия, принято называть геном. В норме содержащаяся в ДНК генетическая информация (гены) стереотипно воспроизводится при клеточных делениях и передается потомству без изменений. Однако под влиянием тех или иных факторов окружающей среды гены могут изменяться. В этом случае изменяется соответствующий признак у бактерий, контролируемый измененным геном, проявляется генотипическая изменчивость.

В настоящее время наиболее изученными формами генотипической изменчивости являются: генные мутации и рекомбинации.

Мутации. Под мутацией следует понимать наследственные структурные изменения генов, возникающие в результате нарушений конфигураций или последовательности одной и более пар азотистых оснований (нуклеотидов) в молекуле ДНК. Следствием мутаций является возникновение мутантов, которые появляются независимо от среды, доступной для их адаптации. В зависимости от происхождения все мутации классифицируют на спонтанные и индуцированные. Мутации, которые возникают в нормальных условиях самопроизвольно и имеют случайный (ненаправленный) характер как во времени, так и в пространстве, называют спонтанными. Мутации, возникающие после воздействия на бактерии физическими, химическими или биологическими мутагенными факторами, называют индуцированными. Мутации приводят к приобретению или утрате признака, присущего клетке. Мутации, затрагивающие один ген, называют генными мутациями, а распространяющиеся на два и более гена — хромосомными. Различают следующие виды мутаций: а) делеции — выпадение большого числа нуклеотидов в полинуклеотидной цепи; б) инверсии — поворот участка хромосомы на 180° ; в) дупликации — удвоение (повторение) участка хромосомы; г) дислока-

ции — перестановка сегментов хромосомы; д) точковые мутации — замена или вставка одной пары азотистых оснований (транзиции и трансверсии).

Все мутации подразделяют на прямые и обратные (реверсивные). Прямые мутации встречаются у организмов «дикого» типа (прототрофов) и проявляются в потере бактериями самостоятельной способности синтезировать какие-либо факторы роста (например, аминокислоты). Такие мутанты называются ауксотрофными. Обратные мутации сопровождаются реверсией (возвратом) к дикому типу. Возврат к дикому типу может быть обусловлен истинной реверсией, когда восстанавливается структура и функция того генома, который был нарушен при прямой мутации (например, возврат измененной пары ГЦ на АТ). При истинной реверсии восстанавливается не только дикий фенотип, но и генотип. Однако реверсия может происходить также и вследствие мутации в другой сайте, или локусе. Такие обратные мутации (реверсии) называются супрессорными. Такие ревертанты фенотипически отличаются от организмов дикого типа и истинных ревертантов меньшей выраженностью функции.

Результатом мутаций являются самые разнообразные фенотипические изменения бактерий, среди которых наиболее распространены: потеря способности самостоятельно синтезировать аминокислоты, пурины и пиримидины, витамины и др.; потеря способности сбраживать углеводы; появление устойчивости к фагам, физическим и химическим факторам и антибиотикам; изменения антигенных свойств, вирулентности, морфологии клеток и колоний.

Генетическая рекомбинация. Генетические рекомбинации обозначают стойкие наследственные изменения свойств одних бактериальных клеток под влиянием ДНК других бактериальных клеток. В механизме рекомбинаций лежит включение фрагмента или фрагментов хромосомы от бактерий (или вирусов) — доноров в хромосому бактерий — реципиентов. Из клетки-донора в клетку-реципиент переносится, как правило, не полная хромосома, а лишь часть генетического материала. Перенесенный фрагмент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента, и отдельные их участки обмениваются. В результате этого образуются рекомбинанты, которые в основном сохраняют генотип бактерий-

реципиента, приобретая отдельные свойства бактерий-донора. При последующем делении ядра и клетки образуются бактерии, содержащие только рекомбинированные хромосомы. Передача генетического материала от бактерий-доноров бактериям-реципиентам может осуществляться путем трансформации, трансдукции и конъюгации. Трансформация — это изменение признаков бактерии-реципиента в результате проникновения из среды молекул ДНК, экстрагированных из бактерий-доноров другого штамма того же вида, но имеющего наследственно отличительные особенности. В трансформации участвуют ДНК бактерий-доноров и бактерии-реципиенты, воспринимающие ДНК донора.

В опыте трансформации используются чаще всего ауксотрофные штаммы *Bac. subtilis*, зависящие по триптофану (*Trp*⁻).

Частота трансформации зависит от вида трансформируемых бактерий, от способности клеток-реципиентов воспринимать ДНК, т. е. их компетентности, а также от концентрации ДНК, прибавляемой к трансформируемым бактериям. Наибольшей трансформирующей активностью обладает нативная ДНК.

Трансдукция — это перенос фрагментов ДНК от одних бактериальных клеток другим с помощью трансдуцирующих умеренных фагов. Размножаясь в бактериях и вызывая их лизис, трансдуцирующие фаги включают в состав своего генетического материала фрагмент хромосомы бактерий-донора. Такие фаги называются дефектными. Они теряют способность лизогенизировать трансдуцируемые бактериальные клетки-реципиенты. Однако они остаются способными заражать своим генетическим материалом клетки бактерий-реципиентов того же вида. Проникшая в клетку фаговая ДНК может встраиваться в бактериальную хромосому или автономно располагаться в цитоплазме реципиентной клетки. В первом случае, т. е. когда ДНК фага с фрагментом хромосомы донора включается в хромосому реципиента, передается несколько различных генетических детерминант от бактерий-доноров (общая трансдукция) или только какие-либо отдельные гены (специфическая трансдукция).

В результате интеграции генетического материала клетки-реципиента и ДНК дефектного фага формируются рекомбинанты-прототрофы, несущие при делении

признаки двух родительских клеток. Инфицированные дефектным фагом бактерии в обычных условиях не могут продуцировать и высвобождать свободный фаг. Дефектные фаговые частицы могут продуцироваться только в случае, если в клетке-реципиенте присутствует недефектный фаг (в виде профага) или в результате суперинфекции недефектным фагом.

Во втором случае, т. е. когда ДНК дефектного фага с фрагментом хромосомы донора автономно располагаются в цитоплазме реципиента, трансдуцированные гены не включаются в генетический аппарат реципиентных бактерий. Присутствуя в клетках, они проявляют себя функционально. При делении клеток фрагмент хромосомы, привнесенный фагом, не делится и передается только одной клетке. Трансдукция обнаружена и хорошо воспроизводится в экспериментах с сенной палочкой (*Bac. subtilis*), кишечной палочкой (*E. coli*), псевдомонасом (*Ps. aeruginosa*), сальмонеллами (*Salm. typhimurium*) и рядом бактерий других видов.

Конъюгация заключается в одностороннем переносе генетического материала от бактерий-доноров в клетки бактерий-реципиентов в результате их контакта. Этот процесс подобен оплодотворению мужской клеткой, обозначаемой F^+ (обладает фактором плодовитости — *fertility*), женской клетки, обозначаемой F^- (не обладает фактором плодовитости). Донорская способность клеток определяется наличием у них специальных конъюгативных плазмид. В настоящее время известны два типа клеток-доноров F^+ и *Hfr*, различающихся видом плазмиды и характером ее локализации в клетке. Плазмиды F в клетках типа F^+ располагаются автономно по отношению к хромосоме клеток F^+ , т. е. является внехромосомной структурой. Передавая плазмиду F с высокой частотой, клетки F^+ не способны к переносу хромосомных генов донора.

Плаزمиды F в клетках типа *Hfr* включена в хромосому, т. е. находится в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-донора. Эти клетки обладают способностью переносить хромосомные гены с высокой частотой рекомбинации (откуда и происходит их название *Hfr-high frequency of recombination*). На поверхности клеток-доноров, несущих плазмиду F , синтезируются специфические жгутикоподобные образова-

ния — *F*-пили. При конъюгации бактерий *F*-пили участвуют в образовании конъюгационного цитоплазматического мостика, через который осуществляется перенос генетического материала из клетки-донора в реципиентную клетку (рис. 52).

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Выделенная и очищенная ДНК прототрофного штамма-донора (*Bac. subtilis*, Trp^+ , Str^r), культура компетентных клеток-реципиента ауксотрофного штамма триптофану (*Bac. subtilis*, Trp^- , Str^s), чашки с минимальной средой Спидейзена, содержащей 100 ед/мл стрептомицина, фаз и *E. coli*, lac^+ , культура ауксотрофного штамма *E. coli*, lac^- , чашки со средой Эндо, культура *E. coli* типа *Hfr*, Trp^+ , Leu^- , Thr^- , культура *E. coli* типа F^+ , Trp^- , Leu^+ , Thr^+ , чашки с минимальной средой, стерильные пустые пробирки, бактериологическая петля, термостат, штативы.

Задание. 1. Поставить опыт по трансформации. 2. Поставить опыт по трансдукции. 3. Поставить опыт по конъюгации.

Методические указания. Для постановки опыта по трансформации необходимо иметь бактерии-доноры, являющиеся источником получения трансформирующей ДНК, и компетентные клетки бактерий-реципиентов, способных воспринимать ДНК-донора. Чаще всего для этих целей используют *Bac. subtilis*, Trp^+ , прототрофный штамм для получения ДНК и ауксотрофный по Trp^- , в качестве реципиента.

Сущность опыта состоит в следующем. Ауксотрофному штамму *Bac. subtilis*, чувствительному к стрептомицину и нуждающемуся в триптофане



Рис. 52. Конъюгация у бактерий

для роста, может быть передано с ДНК прототрофного штамма свойство резистентности к стрептомицину и расти на среде без триптофана. У штамма-ауксотрофа нарушен синтез фермента триптофансинтетазы. Он не может расти на среде, не содержащей триптофана. Прототрофный штамм-донор этот фермент синтезирует, поэтому он может расти на средах без триптофана, синтезируя его из других компонентов среды. При смешивании выделенной и очищенной ДНК прототрофного штамма с культурой компетентных клеток ауксотрофа происходит проникновение ДНК в реципиентную клетку и ее интеграция в хромосому. Реципиентная клетка-ауксотроф восстанавливает способность синтеза триптофансинтетазы и приобретает свойство расти на среде без триптофана.

Постановка опыта трансформации проводится следующим образом (рис. 53): в пробирке смешивают по 0,5 мл очищенной ДНК бактерий-доноров (прототроф) и чистой культуры ауксотрофных компетентных клеток *Bac. subtilis*. Концентрация ДНК должна быть невысокой — 1—2 мкг/мл и разведена 0,85% раствором хлористого натрия. Пробирки ставят в термостат на

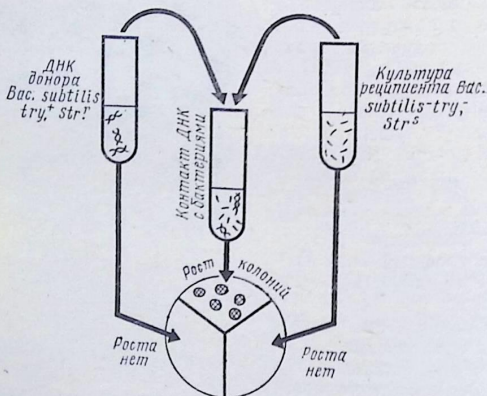


Рис. 53. Схема постановки опыта трансформации

30 мин для инкубации. Оптимальная температура инкубации 34—36° С. После этого производят посев петлей на среду Спицейзена в чашку Петри:

Среда Спицейзена:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 г	MgSO_4	0,1 г
K_2HPO_4	6,0 г	глюкоза	5,0 г
K_2HPO_4	14,0 г	агар-агар	25 г
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (цитрат Na)	1,0 г	вода дистилл.	1000 мл

L-аминокислоты, в которых нуждается штамм (кроме триптофана)—по 50 мг, гидролизат казеина—200 мг. Стерилизовать при 0,5 атм 30 мин. Растворы аминокислот и гидролизата казеина можно стерилизовать кипячением и добавлять в среды после автоклавирования.

В качестве контроля на секции этой же чашки делают высев из пробирки с ДНК и из пробирки с культурой реципиента.

Посевы ставят в термостат с температурой 34—36° С. Через двое суток производят учет результатов. Там, где был сделан высев из смеси бактерий и ДНК, имеется рост большого количества мелких колоний *Bac. subtilis*; на секциях чашки, где был высев из пробирок с ДНК и чистой культурой реципиента-ауксотрофа, роста нет.

Для постановки опыта по трансдукции (рис. 54) необходимо иметь трехчасовую бульонную культуру реципиента *E. coli*, *lac*[−] и умеренный трансдуцирующий фаг λ *d gal*, выделенный фильтрованием из прототрофной культуры-донора. Для этих целей вполне подходящими считаются ауксотрофная по лактозе (*lac*[−]) кишечная палочка (*E. coli*, *lac*[−]) и фаг, выделенный из *E. coli*. Сущность опыта состоит в том, что при контакте реципиентных клеток *E. coli*, *lac*[−] с умеренным трансдуцирующим фагом λ *d gal*, полученным из клеток-доноров *E. coli*, *lac*⁺, происходит инфицирование реципиента фагом и передача ему гена, ответственного за синтез фермента β-галактозидазы. Бактерия-реципиент ауксотроф *lac*[−] восстанавливает способность синтеза этого фермента и приобретает свойство разлагать лактозу. Постановка опыта трансдукции проводится следующим

образом: в пробирку вносят пипеткой 0,5 мл трансдуцирующего фага, полученного фильтрованием из фаголизата прототрофной культуры *E. coli*, *lac*⁺. В эту же пробирку добавляют стерильно одну петлю трехчасовой бульонной культуры *E. coli*, ауксотрофной по лактозе (*lac*⁻). Пробирки ставят для инкубации на 20—30 мин в термостат при 37° С. После этого 0,1 мл культуры вы-

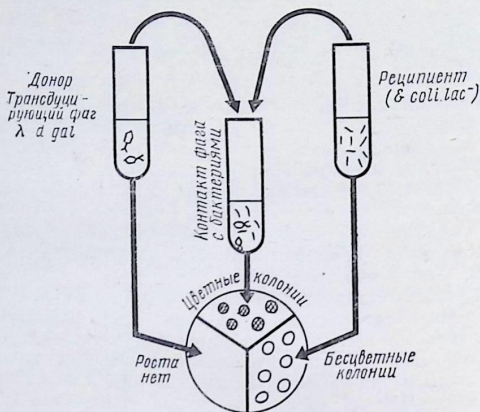


Рис. 54. Схема постановки опыта общей трансдукции

севают на одну секцию чашки Петри со средой Эндо. На вторую секцию чашки высевает 0,1 мл исходной культуры *E. coli*, *lac*⁻—реципиент без фага, на третью—трансдуцирующий фаг. Посевы инкубируют в термостате в течение суток. На контрольной секции чашки Петри будут расти мелкие лактозонегативные (бесцветные) колонии *E. coli*. На опытной половине чашки при образовании *lac*⁺-рекомбинантов (их называют трансдуктантами) на среде вырастают лактозопозитивные (красные) колонии *E. coli*, разлагающей лактозу. На третьей секции роста не будет, так как высевали фаг.

Для постановки опыта конъюгации (рис. 55) нужны два штамма *E. coli* K12. В качестве донора

используется штамм *E. coli*, *Hfr*⁻ *Leu*⁺, *Str*^s (высокой частоты рекомбинации), ауксотрофный по тимину, с генотипом *Thr*⁺, *Leu*⁺, *Tyr*⁺. Реципиентом служит культура *E. coli*, *F*⁻, *Leu*⁻, ауксотрофная по треонину и лейцину, с генотипом *Thr*⁻, *Leu*⁻, *Tyr*⁺, *Str*^r.

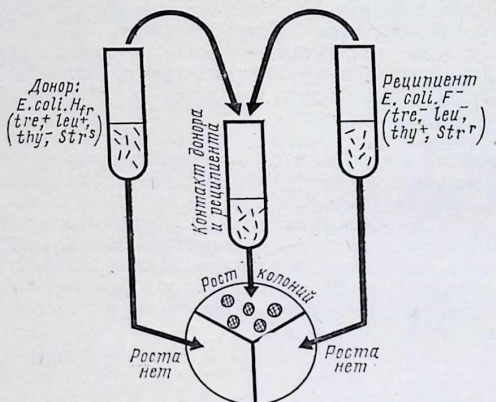


Рис. 55. Схема постановки опыта конъюгации

Для выделения рекомбинантов используют среду М-9 со стрептомицином.

Состав среды М-9:

глюкоза	1,0 г	KH ₂ PO ₄	3,0 г
стрептомицин 200 ед./мл		MgSO ₄	0,2 г
NH ₄ Cl	1,0 г	вода дистилл.	1000 мл
NaCl	0,5 г	агар-агар	20,0 г
Na ₂ HPO ₄	6,0 г		

Стерилизовать среду автоклавированием при 0,5 атм 30 мин.

Сущность опыта заключается в том, что на этой среде могут расти только рекомбинанты, а культуры донорского и реципиентного штаммов не растут. Это

связано с тем, что донор-ауксотроф по тимину, а реципиент — по треонину и лейцину. Постановка опыта: к 0,5 мл 3-часовой бульонной культуры реципиента добавляют 0,5 мл 3-часовой культуры донора. Смесь инкубируют в течение 30 мин при 37°С. Затем смесь разводят стерильным физиологическим раствором в 100 или 1000 раз. Из разведения делают высев 0,1 мл на одну секцию чашки Петри со средой М-9. Для контроля на две следующие секции высевают исходные культуры донора и реципиента в том же объеме. Чашки инкубируют в термостате при 37°С в течение суток. Через сутки учитывают результат. На секциях с посевом донора и реципиента роста не будет, так как оба штамма ауксотрофны и не могут синтезировать соответствующие аминокислоты из среды. На секции чашки, где была высеяна смесь культур, будут расти колонии *E. coli*. Это обусловлено тем, что в результате конъюгации двух ауксотрофных мутантов произошла передача клеткам-реципиентам от донора генетического локуса, ответственного за синтез лейцина и треонина. Образовался рекомбинант, прототрофный по этим аминокислотам.

Глава IV

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ, ВОДЫ И ВОЗДУХА

Микрофлора почвы

Почва является благоприятной средой для развития и накопления многих видов бактерий, грибов, простейших и вирусов. Это обусловлено тем, что в почве сосуществуют одновременно лито-, гидро- и атмосфера в виде твердой органо-минеральной части, почвенного раствора и газов. Здесь в одно и то же время протекают противоположные биологические процессы — синтез и распад веществ, окисление и восстановление, развитие аэробных и анаэробных микроорганизмов и др. В почве исключительно четко проявляются симбиоз, метабиоз и антагонизм микробов и, как ни в каком ином местообитании, обнаруживается необычно богатый их видовой состав.

Почвенная вода и растворенные в ней твердые вещества и газы образуют своеобразную среду — почвенный раствор. Состав раствора определяет в значительной степени рост, размножение и метаболизм микроорганизмов в почве. В почвенном растворе вещества находятся в форме истинных и коллоидных растворов. Минеральный состав их весьма разнообразен: встречаются нитриты и нитраты, карбонаты, бикарбонаты, сульфаты, фосфаты, хлориды в виде солей Ca, Na, K, Mg, а также соединения железа, алюминия, марганца, кремния, ряд микроэлементов и др. Содержание растворенных веществ в почвенном растворе колеблется в пределах от 0,05 до 0,5% от сухой массы почвы. Оно меняется в зависимости от типа почвы, технологии ее обработки и других факторов.

Органическое вещество в почвах находится в виде разнообразнейших соединений в твердой, жидкой и газообразной фазах. Общий запас органических веществ почвы достигает 400 т/га; из них большая часть находится в поверхностном слое почвы (от 0 до 30 см). Примерно половина содержащегося в почве гумуса нахо-

дится в этом слое. Главной составной частью органических веществ почвы являются остатки животных и растительных тканей, а также микробов, количество которых колеблется в пределах 3—8 т/га.

Попавшие в почву растительные остатки, отмершие клетки микробов и животных подвергаются действию биологических факторов и начинают разлагаться вначале под действием собственных ферментов, а затем под влиянием ферментов микробов. Разложение органического вещества происходит либо до конечных продуктов (CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S), либо до промежуточных — органические кислоты, аминокислоты, спирты. Эти процессы превращения органических остатков протекают в отдельных микроочагах.

Одновременно с разложением органических веществ в почве происходят синтетические процессы. В почве обитает большое количество автотрофных микроорганизмов, способных синтезировать органические вещества собственной клетки, ассимилируя CO_2 . К ним относятся водоросли (фотоавтотрофы), многие бесцветные и пигментированные бактерии — серобактерии, железобактерии, водород- и метанооксиляющие бактерии и др.

В результате жизнедеятельности микроорганизмов в почве накапливаются аспарагиновая, глутаминовая и другие аминокислоты, полиурониды, витамины (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12}), пантотеновая, никотиновая, фолевая, парааминобензойная кислоты, биотин, а также ауксин и ферменты. Все эти вещества часто обнаруживаются в свободном состоянии.

Другая группа органических веществ почвы представлена гумусовыми веществами (гуминовые кислоты и фульвокислоты), представляющими комплекс высокомолекулярных полимерных природных веществ. На долю гумуса приходится 85—90% всего запаса органических веществ почвы, что составляет 340—300 т/га.

Наиболее активной по отношению к микроорганизмам является жидкая фаза почвы, т. е. почвенный раствор. В нем содержатся растворенные минеральные и органические вещества. Раствор циркулирует по капиллярам между твердыми частицами и малорастворенными органическими остатками почвы. Этот раствор представляет собой биогенный химический реактив, состав которого зависит от типа почв, степени их окультуренности, системы обработки и других факторов.

Именно в почвенном растворе и на твердых частицах почвы, омываемых раствором, развивается и проявляет свою жизнедеятельность большинство микроорганизмов. В результате постоянного передвижения почвенного раствора продукты обмена веществ микроорганизмов не накапливаются в одном месте и не отравляют среду. Кроме того, микробы поселяются на почвенных частицах микрозонами. Появившиеся продукты метаболизма одних микробов сразу потребляются другими микробами.

Распределение микроорганизмов в почве до сих пор изучено недостаточно. По-видимому, большинство микроорганизмов в почвах располагается в микроочагах. Это зависит как от состава органических веществ почвенных микрозон, так и от тех взаимоотношений, которые складываются между микроорганизмами. Очень важным фактором, регулирующим распределение микроорганизмов в естественных средах, являются почвенно-географические и климатические условия существования микробов, т. е. эколого-пространственные закономерности распределения микроорганизмов и специфика микронаселения почвенных типов. Наиболее богаты бактериями черноземные почвы, каштановые и сероземы.

Количество бактерий в почвах, богатых органическими веществами, достигает иногда нескольких десятков миллиардов в 1 г. Несколько в меньшей степени распространены в почве актиномицеты. Их количество в 1 г почвы не превышает 10 млн. Грибы встречаются в количестве сотен тысяч и миллионов, а число водорослей и простейших — нескольких сотен тысяч в 1 г почвы. Микроорганизмы, обитающие в почве, в большинстве случаев имеют меньшие размеры, чем те же микроорганизмы, выращенные на питательной среде в лаборатории.

При изучении микрофлоры почвы необходимо помнить, что количественные показатели содержания микробов зависят больше от метода исследования, а не от истинного содержания их. Наиболее достоверными следует считать данные, полученные при использовании прямых методов анализа. Подавляющее большинство почвенных микроорганизмов принадлежит к сапрофитам, играющим большую роль в разложении органического комплекса почвы и создании ее плодородия.

дня. Лишь незначительное количество их относится к патогенным видам. Они попадают в почву с выделениями больных людей и животных, с отбросами предприятий, перерабатывающих животное сырье, с трупами животных, с остатками больных растений. Поэтому качественный и количественный состав микрофлоры почвы определяют как ее плодородие, так и санитарное благополучие. Знание микробиологического пейзажа почвы и направления биохимических процессов, происходящих в ней под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов, позволяет судить о плодородии почвы. В нужных случаях можно и должно направлять эти процессы на повышение урожайности сельскохозяйственных культур, а также на борьбу с патогенными для животных и растений видами микробов.

Бактериологическое исследование почвы включает: а) определение общего количества сапрофитных микробов; б) определение количества микробов различных физиологических групп (аммонифицирующих, азотфиксирующих и др.); в) определение микробов-антагонистов и выявление их активности; г) определение санитарно-показательных микробов (кишечной палочки). При специальных эпидемиологических и эпизоотологических обследованиях производят определение в почве патогенных микроорганизмов.

Для бактериологического исследования почву берут в стерильные мешочки из синтетической ткани или в стеклянные банки с притертой пробкой. Для получения наиболее полного представления о составе микрофлоры почвы берется несколько проб с площади 25 м². Из различных мест по диагонали участка пробы берутся в 4—5 точках на глубине 10—30 см по 100—200 г. Из общей пробы после тщательного перемешивания берут средний образец почвы массой около 0,5 кг. Этот образец просеивают через металлическое сито с диаметром отверстий около 2 мм.

Пробы из поверхностных слоев почвы берут с помощью стерильной ложечки, совочка или ножа. Для взятия проб из глубины пользуются специальным буром Френкеля. При ввинчивании бура в почву его полое пространство закрывается прижимаемой во время вращения заслонкой. При достижении необходимой глубины бур поворачивают в обратную сторону, заслонка открывается, а полость заполняется почвой. Затем

поворотом бура в первоначальном направлении закрывают заслонку, бур вынимают из земли и почву из его полости высыпают в стерильную посуду. Бактериологическое исследование почвы проводится в день взятия образцов.

Наличие большого количества микробов в почве является условным показателем ее плодородия. Для более точного представления о плодородии почвы производят исследование на наличие в ней определенных физиологических групп микробов — аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих, целлюлозоразрушающих, азотфиксирующих и других и определение их активности. Для этого применяют специальные селективные методы, основанные на принципе выделения каждой физиологической группы микроорганизмов на специальных селективных средах (по С. Н. Виноградскому).

При выделении микроорганизмов из почвы следует учитывать, что каким бы методом ни пользовались, какую бы среду ни применяли, все имеющиеся в почве микроорганизмы не вырастут на ней. Поэтому к результатам исследования, полученным путем посева почвы на плотные питательные среды, следует относиться с осторожностью. При сравнительной характеристике обычно упоминают, что на такой-то среде (допустим, мясо-пептонном агаре) выросло столько-то колоний.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Навески почвы по 10 г, колбы с 90 мл стерильной воды—1 шт., пробирки с 9 мл стерильной воды в штативах по 6 шт. (на двух студентов), чашки Петри стерильные (по одной на студента), пипетки стерильные на 1 мл, пробирки с 20 мл стерильного расплавленного МПА (по одной на студента), предметные стекла, квадратики из бумаги 2×2 см, набор реактивов для окраски по Граму, бактериологическая петля, микроскоп с осветителем, посевы предыдущего занятия (пестрый ряд), чашки Петри с плотной средой Эшби (по одной на студента).

Задание. 1. Произвести дифференциацию культуры микробов по характеру роста на пестром ряде.

2. Приготовить разведения и произвести посев из почвы на МПА для определения общего количества микробов.

3. Приготовить препараты и произвести прямой счет микробов в почве по С. Н. Виноградскому.

4. Произвести посев на среду Эшби для выделения азотобактера.

Методические указания. Образцы почвы освобождают от крупных частиц: корней, щебня, стекла. Крупные комочки почвы предварительно измельчают. Затем образцы просеивают через стерильное сито с диаметром отверстий не более 3 мм. Образцы почвы тщательно перемешивают и из общей смеси для разведения отбирают навеску не менее 10,0 г.

Вся лабораторная работа по изучению микрофлоры почвы, воды, воздуха и кормов проводится бригадным методом. Бригада студентов из двух — четырех человек получает задание по исследованию почвы, воды или воздуха и выполняет это задание в соответствии с методикой.

Определение общего количества микробов в почве. Навеску почвы вносят в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды. Содержимое колбы энергично взбалтывают в течение 3—5 мин до получения равномерной взвеси. После 1,5—2-минутного отстаивания из приготовленной взвеси (1:10) стерильной пипеткой берут 1 мл болтушки и вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды. Получают разведение 1:100. После хорошего перемешивания в течение 1 мин и отстаивания в течение 30 с из пробирки берут 1 мл взвеси стерильной пипеткой и переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды. Получают разведение 1:1 000. Аналогичным образом переносят 1 мл взвеси из второй пробирки в третью, из третьей в четвертую и т. д., получая нужные десятикратные разведения (рис. 56). Обычно готовят разведения до 1:1 000 000. Для приготовления очередного разведения используется новая стерильная пипетка.

Заготовив разведения, приступают к глубинному посеву. Из каждой пробы почвы должно быть использовано для посева не менее двух различных разведений в зависимости от предполагаемого содержания микробов в почве. Перед посевом содержимое пробирок тщательно перемешивают. Затем стерильной пипеткой набирают 1 мл суспензии и переносят на дно стерильной чашки Петри. Из каждого разведения должен быть сделан посев минимум в две чашки. Чашки с почвенной

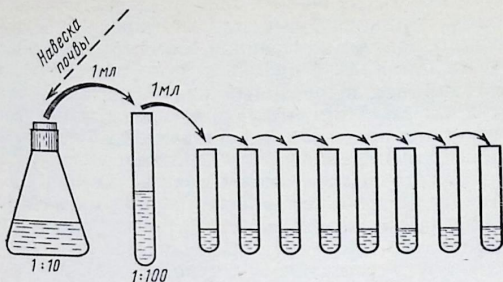


Рис. 56. Схема последовательных разведений почвы

взвесью заливают 20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C мясо-пептонного агара. Осторожным покачиванием чашки перемешивают почвенную болтушку с питательной средой. После застывания агара чашки помещают вверх дном в термостат с температурой $30-35^{\circ}\text{C}$ на 24—48 ч, а затем выдерживают 1—2 сут при комнатной температуре. На крышке чашки предварительно указывается номер группы, фамилия студента и степень разведения почвенной взвеси.

Количество микроорганизмов, содержащихся в 1 г почвы, определяют по количеству выросших в чашке колоний. Для подсчета необходимо брать такие разведения, при которых на чашках вырастает от 50 до 150 колоний. Чашки с количеством колоний менее 50 считаются недостоверными. При большом количестве выросших колоний (более 150) производят подсчет на $\frac{1}{4}$ чашки с последующим пересчетом на всю ее площадь. Из суммы колоний, выросших на двух чашках, выводят среднеарифметическое число и производят пересчет на число бактерий, содержащихся в 1 г почвы. Для этого среднее число колоний, выросших в чашках соответствующего разведения, умножают на степень разведения.

Например. В чашках, засеянных почвенной суспензией из разведения 1:10 000, выросло в среднем 60 колоний. $60 \times 10\,000 = 600\,000$ бактерий содержится в 1 г почвы.

Метод прямого счета микробов (по Виноградскому). Из вторичной разводки (разведение 1:100) после 1,5—

2-минутного отстаивания берут стерильной пипеткой болтушку и наносят 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло. Капля нанесенной взвеси распределяется по стеклу на площади 4 см². Для этого под стекло подкладывают заранее вырезанный из бумаги квадратик размером 2×2 см. Приготовленный препарат высушивают, фиксируют на пламени, окрашивают по Граму и микроскопируют иммерсионным объективом. В приготовленном препарате подсчитывают количество бактерий, приходящихся на 100 полей зрения микроскопа или 100 квадратиков окулярной сетки. Затем высчитывают среднее количество бактерий, приходящееся на 1 поле зрения или один квадратик окулярной сетки. Зная площадь поля зрения или квадрата окулярной сетки, подсчитывают количество бактерий, содержащихся в 1 г почвы. Так, если квадратик сетки имеет площадь 0,004 мм² (край сетки — 0,02 мм), то на 1 см он будет повторяться 25 000 раз, а на всем препарате — 100 000 раз. Допустим, что в одном квадратике обнаружено в среднем 2,0 бактерии. Отсюда на всем препарате площадью 4 см² будет $2,0 \times 100\,000 = 200\,000$ бактерий. Поскольку брали 0,1 взвеси, содержащей 0,0001 г почвы, то это количество бактерий содержится в указанной навеске почвы, а в 1 г будет содержаться бактерий в 10 000 раз больше ($1\text{г}:0,0001 = 10\,000$). Отсюда $200\,000 \times 10\,000 = 2$ млрд.

Недостатком метода Виноградского следует признать невозможность разграничить живые и мертвые клетки микроорганизмов. В силу этого и данные, полученные по этому методу, заметно превышают фактическое содержание живых бактерий в почве.

Определение азотобактера в почве. 1. На плотную среду Эшби в чашках Петри (см. с. 212 — «Свободноживущие в почве азотфиксаторы») наносят пипеткой по одной капле почвенной суспензии из двух последних разведений. Каплю втирают в поверхность среды стерильным стеклянным шпателем. Чашки помещают в термостат с температурой 28—30° С. Через 6—7 сут учитывают колонии азотобактера. *Azotobacter chroococcum* образует растекающиеся, слизистые, слегка выпуклые, блестящие, гладкие или бугристые колонии с неровными краями. Сначала колонии бесцветные, а с возрастом становятся темно-бурыми, коричневыми или даже черными. Среда вокруг колоний остается неокра-

шенной. Вместе с азотобактером на среде Эшби могут развиваться микроорганизмы, объединяемые в группу так называемых олигонитрофилов. К ним относятся малоактивные азотфиксаторы и бактерии, довольствующиеся малыми дозами азота, содержащегося в среде.

При малом содержании азотобактера в почве лучшие результаты получают при посеве почвенных комочков.

2. Берут небольшое количество почвы, увлажняют ее водой до пастообразного состояния и хорошо растирают в чашке резиновым пестиком или пальцем в резиновой перчатке. Бактериологической петлей или иглой берут небольшие комочки из приготовленной почвы и раскладывают их правильными рядами на агар Эшби в чашках Петри. На одну чашку можно поместить до 50 комочков почвы. Чашки помещают во влажную камеру и ставят в термостат для инкубации. Через 5—6 сут вокруг комочков почвы на питательной среде вырастают колонии азотобактера (рис. 57).

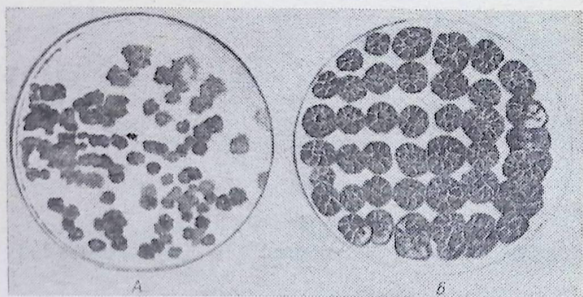


Рис. 57. Посев из почвенной суспензии (А) и комочков почвы (Б) для выявления азотобактера

Определение микробов-антагонистов

Почвенные микроорганизмы выделяют в окружающую среду различные метаболиты (антибиотики, витамины, гибберелины, токсины, ферменты и др.), которые оказывают определенное влияние на жизнь других

обитателей почвы, на растения, а через них — на организм животных и человека. Эти вещества могут благоприятно действовать на других обитателей почвы, вызывая усиление их роста и активности. Такие взаимоотношения называются симбиозом. Иногда же продукты жизнедеятельности одного микроба (или группы микробов) препятствуют развитию другого микроорганизма (бактериостатическое действие). Это явление называется антагонизмом. Явление антагонизма рассматривается как одна из форм борьбы за существование среди микроорганизмов. Микробы-антагонисты чаще всего встречаются там, где наиболее бурно протекает жизнедеятельность различных групп микробов. Антагонистическими свойствами обладают представители всех групп микроскопических существ, обитающих в почве (бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли, простейшие). Однако чаще всего эти свойства проявляются у бактерий, актиномицетов и грибов. Изучение продуктов метаболизма микробов-антагонистов позволило получить большое количество антимикробных препаратов, называемых антибиотиками. Многие антибиотики получены в чистом виде и находят широкое применение в медицине, ветеринарии, животноводстве, растениеводстве и фитопатологии.

Помимо антибиотиков микроорганизмы выделяют в окружающую среду (чаще всего в почву) другие продукты обмена, например органические кислоты, спирты и тому подобные вещества. Многие из этих соединений могут оказывать токсическое действие на некоторые группы микроорганизмов или даже на высшие растения.

Существует большое количество методов выделения из внешней среды микробов-антагонистов и определения их активности.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Навески почвы по 1 г, 6 пробирок с 9 мл стерильной дистиллированной воды, пробирки с культурами микробов (тест-микробов): *Bac. mycoides*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Azotobacter chroococcum*, чашки с ростом и других антагонистов (3—5 культур), чашки с почвой для изготовления пасты, резиновый пестик или перчатка, колба с 50 мл стерильной воды, стерильные чашки Петри (по одной на студента), чашки со стерильными средами: Эшби, МПА, питательным агаром и блочком в центре, стерильные целлофановые кру-

жочки, стерильные пробочные сверла (диаметр 8—20 мм), пинцеты, скальпели, бактериологические петли.

Задание. 1. Произвести посев из почвенной суспензии или комочками почвы для выделения микробов-антагонистов.

2. Определить антагонистическую активность микробов: а) методом перпендикулярных штрихов; б) методом агаровых блочков; в) методом центрального блочка.

3. Определить токсичность почвы к азотобактеру.

Методические указания. Выделение антагонистов из почвы.

1. На чашки Петри с мясо-пептонным или бобово-пептонным агаром высевают тест-микроб сплошным «газоном». Чашки помещают в термостат при температуре 26—28° С. Через 1—2 сут на поверхность чашки с тест-микробом наносят бактериологической петлей 10—20 капель из почвенной суспензии. Чашки помещают в термостат. Через 1—2 сут на месте нанесения капель развиваются колонии микробов, содержащихся в почве. Если в почве содержатся микробы-антагонисты, то они в процессе своего развития будут задерживать рост или вызывать гибель тест-бактерий. Вокруг таких колоний появится зона, свободная от тест-микробов. Из этих колоний или зон в дальнейшем выделяют чистую культуру антагонистов.

2. На чашку Петри с заранее засеянным тест-микробом раскладывают небольшие (с просыное зерно) комочки почвы. Чашки помещают в термостат. Через 1—2 сут (а иногда и более) чашки просматривают. Отмечают комочки, вокруг которых образовались зоны задержки роста тест-организма. Из этих участков выделяют чистые культуры антагонистов и подвергают их дальнейшему изучению.

Определение активности антагонистов. *Метод перпендикулярных штрихов.* На поверхность стерильного мясо-пептонного агара в чашке Петри высевают суточную бульонную культуру микроба-антагониста, например *Bac. mesentericus*. Посев делают широкой полосой по центру чашки. Чашки помещают в термостат на 1—2 сут. За это время бактерии хорошо разовьются, а образуемое ими антибиотическое вещество продиффундирует в толщу агара. Лучше эту работу выполнить заранее сотрудиникам кафедры.

После того как микробы хорошо разовьются, перпендикулярно первичному посеву подсевают параллельными штрихами бактериологической петлей различные тест-организмы. Для этих целей можно использовать чистую культуру *Bac. mycoides*, *Sarcina lutea* и *Staphylococcus aureus*. Чашки помещают в термостат при температуре 26—28° С на 20—24 ч.

Если изучаемый микроорганизм выделяет вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-микробов, то последние будут расти вдали от штриха антагониста. Нечувствительные микробы будут развиваться в непосредственной близости от штриха изучаемого антагониста (рис. 58).

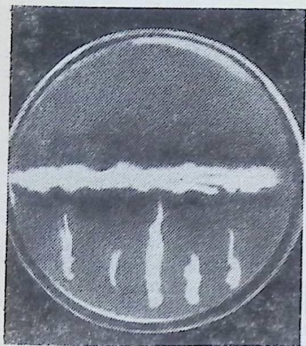


Рис. 58. Определение антагонизма у микробов методом перпендикулярных штрихов

Метод агаровых блоков. Изучаемый микроб высевает заранее сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. Используется такая среда, которая наиболее благоприятна для образования антибиотика. Можно засеивать несколько

чашек несколькими антагонистами, обладающими различной активностью.

Студенты на занятиях высевает на поверхность другой агаровой пластинки один тест-микроб (*Staph. aureus*). Стерильным пробочным сверлом (диаметр около 8 мм) вырезают агаровые блоки из первых чашек с выросшими микробами-антагонистами и переносят их на поверхность только что засеянной питательной пластинки МПА. На одну чашку можно разместить 5—6 агаровых блоков. Чашки помещают в термостат на 20—24 ч при температуре, благоприятной для развития тест-организма. Если испытуемый микроб выделяет

антибиотик, то последний диффундирует в питательную среду и задерживает или подавляет развитие тест-микроба. Вокруг агарового блока остается стерильная зона агара. Диаметр зоны отсутствия роста тест-микроба будет тем больше, чем больше выделяется антибиотического вещества и чем оно активнее.

Метод центрального блока. Из пластинки стерильного питательного агара, пригодного для развития изучаемого продуцента антибиотика, вырезают блок диаметром в 20—25 мм. Для этого используют стерильные пробочные сверла или стеклянные трубки. Вырезанные блоки переносят на центр стерильных чашек. В каждую чашку устанавливают один блок. В чашки с блоками выливают расплавленный питательный агар, пригодный для развития тест-микроба. Агар наливают с таким расчетом, чтобы его уровень был на 1—1,5 мм ниже уровня блока (рис. 59). Для удаления избыточной влаги с поверхности агара чашки открывают и устанавливают дном вверх в стерильном термостате на 30—45 мин.

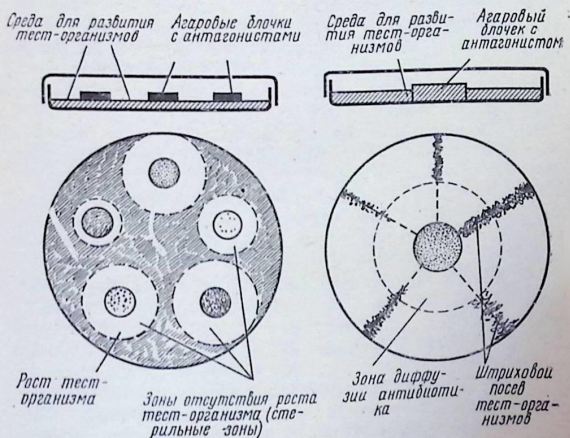


Рис. 59. Определение активности антагонистов методом агаровых блочков

На агаровый блок высевают бактериологической петлей изучаемый антагонист. Чашки помещают в термостат с благоприятной антагонисту температурой и выдерживают 1—2 сут. После хорошего развития микроба по радиусам агаровой пластинки высевают штрихами тест-микроб. Чашки вновь помещают в термостат на 24—48 ч.

Тест-микробы, нечувствительные к антибиотику, выделяемому изучаемым антагонистом, развиваются по всей линии посева, начиная от блока. Отсутствие роста тест-микроба у блока с антагонистом указывает на губительное действие антибиотических веществ, выделяемых изучаемым микробом. Стерильная зона штриха тест-микроба будет тем большая, чем чувствительнее он к выделяемому антибиотику.

Для изучения микробов-антагонистов рациональнее заранее (за 2—3 сут) высевать их на агаровые пластинки, а студенты на занятиях вырезают из них блокки нужного диаметра, раскладывают их на чашки и делают посев тест-микроба.

Определение токсичности почвы к азотобактеру. На свежеприготовленную агаровую среду Эшби, разлитую в стерильные чашки Петри, кладут стерильные целлофановые пластинки, которые готовят заранее. Целлофан нарезают по размеру чашек, смачивают водой, помещают по несколько листочков в чашку и стерилизуют в автоклаве.

На поверхность целлофана накладывают испытываемую почву, предварительно увлажненную до пастообразного состояния. На одну чашку нужно поместить 4—6 аппликаций различных образцов почвы диаметром по 1—1,5 см. Снизу на стекле отмечают карандашом или тушью размеры и место почвенных аппликаций.

Чашки помещают в термостат при температуре 28° С и выдерживают в течение суток. За это время токсические вещества диффундируют через целлофан в питательную среду. Эта часть работы может выполняться заранее сотрудниками кафедры. Через сутки целлофан снимают, а среду засевают сплошным «газоном» культурой *Azotobacter chroococcum*. Если образцы почвы содержат токсические вещества в отношении азотобактера, то на газоне образуются стерильные безмикробные зоны.

Микрофлора воды

Вода различных водоемов представляет собой естественную среду, где бактерии, грибы, простейшие и другие микроорганизмы могут развиваться в значительных количествах.

Главным фактором, определяющим наличие микроорганизмов в воде, является присутствие в ней питательных элементов в виде остатков растений, трупов животных, растворенных органических и минеральных веществ. Чем богаче вода органическими веществами, тем большее количество микробов содержится в ней.

Источником загрязнения водоемов является поверхностный сток с площади водосбора. В этих стоках содержится почвенная микрофлора, а также микрофлора, выделяемая с испражнениями людей, животных и птиц. Сильно загрязняют водоемы сточные воды хозяйственно-бытовых, больничных и некоторых типов промышленных предприятий. Кроме того, микроорганизмы попадают в воду при купании, при стирке и полоскании белья и т. д.

В зависимости от источников заражения водоемов, состав их микрофлоры сильно различается. В воде могут находиться как типичные почвенные сапрофиты, так и приспособившиеся к условиям обитания специфические водные микроорганизмы, а также патогенные виды.

Возбудители инфекционных заболеваний попадают в воду с выделениями больных людей и животных, с необеззараженными сточными и ливневыми водами при прохождении их через зараженную патогенными микробами почву, с трупами животных и т. д. Особую опасность представляют энтеробактерии (брюшной тиф, сальмонеллёзы, дизентерия), холерный вибрион, бруцеллы, палочки туляремии и туберкулеза, патогенные лептоспиры, вирусы полиомиелита, гепатита, инфекционного конъюнктивита, африканской чумы свиней и др. Под влиянием различных неблагоприятных факторов попавшие в воду патогенные микробы в конечном итоге отмирают и наступает самоочищение водоемов. Однако даже кратковременное пребывание, а тем более длительное переживание некоторых видов патогенных микробов в воде делает ее опасной в эпидемиологиче-

ском и эпизоотологическом отношениях. Вода может быть фактором массового распространения инфекций среди людей, животных и растений. В санитарном отношении опасна как вода, содержащая патогенные микроорганизмы, так и вода, содержащая большое количество сапрофитных микроорганизмов. Это связано с тем, что бактериальная загрязненность воды обусловлена наличием в ней большого количества органических веществ, которые могут быть опасными для здоровья человека и животных. Кроме того, использование в промышленном производстве воды с большим содержанием микробов, например при производстве масла, сыра и других пищевых продуктов, ведет к обогащению их микробами и быстрой порче.

Количество сапрофитных микроорганизмов в воде колеблется от нескольких единиц до нескольких миллионов в 1 мл в зависимости от степени загрязнения водоисточника, места и времени взятия проб для анализа. Воды открытых водоемов более богаты сапрофитными микроорганизмами по сравнению с подземными. В прибрежной зоне стоячих водоемов больше микробов, чем в удаленных от берега местах. В дождливую погоду и в период весеннего паводка количество бактерий в воде резко возрастает. Донные отложения — илы — гораздо богаче бактериями, чем вода в водоемах.

Наиболее богат бактериями самый поверхностный слой ила. На нем образуется как бы пленка из бактерий. Здесь встречаются аэробные и анаэробные (меньше!) разрушители клетчатки, аммонифицирующие и нитрифицирующие бактерии, серобактерии, железобактерии и др. Однако деятельность этой микрофлоры менее активна, чем в почве.

Бактериологический анализ воды проводят чаще всего путем высева определенного объема воды на плотные питательные среды. Метод прямого счета бактерий в воде применяется довольно редко, хотя имеет ряд преимуществ перед другими методами (более точно определяется количество бактерий).

Бактериологическое исследование воды производят с целью:

- 1) определения общего числа микробов в 1 мл воды;
- 2) обнаружения санитарно-показательных микроор-

ганизмов, т. е. бактерий, служащих показателем фекального загрязнения воды;

3) обнаружения в воде патогенных микробов, их токсинов и бактериофагов (по эпидемиологическим и эпизоотологическим показаниям).

Важной частью исследования является взятие проб воды. Пробы воды для исследования берут в стерильную посуду. Из открытых водоемов пробы берут с помощью батометра (рис. 60). Этот прибор имеет металлический каркас с массивным дном. В каркас батометра вставляется стерильная бутылка, которая закрывается специальной пробкой с приспособлением для открывания бутылки на нужной глубине. Пробы отбираются из водоемов на глубине 10—15 см от поверхности, а при малой глубине 10—15 см от дна.

При взятии проб из водопровода кран предварительно протирают тампоном, смоченным спиртом, а затем обжигают пламенем. После стерилизации кран полностью открывают, застоявшуюся в трубах воду выпускают в течение 10—15 мин, а затем набирают в стерильные флаконы. Бутылки закрывают стерильной пробкой, наклеивают на них этикетки, в которых указывают номер пробы, место, дату и время взятия пробы, цель исследования. Исследование воды проводится немедленно после взятия или не позднее 2—6 ч с момента взятия при условии транспортировки и хранения при температуре 1—5° С. После доставки проб в лабораторию приступают к немедленному анализу воды на содержание общего количества микробов, санитарно-показательных и патогенных бактерий.

Обнаружение в пробах воды патогенных микроорганизмов обычно связано с большими трудностями и не всегда дает надежный результат. В связи с этим при-

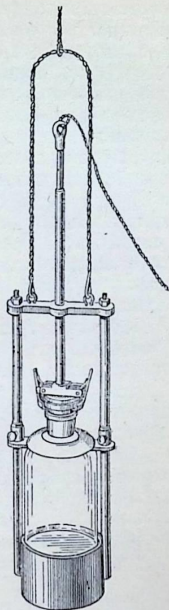


Рис. 60. Батометр

нято использовать косвенные показатели возможного инфицирования воды — коли-титр и коли-индекс. В качестве такого косвенного показателя является определение санитарно-показательных микробов, к которым относится кишечная палочка (*E. coli*). Она постоянно обитает в кишечнике человека и животных. Наличие кишечной палочки в воде указывает на загрязнение ее экскрементами человека или теплокровных животных и на возможное присутствие в ней возбудителей заразных болезней. По количеству кишечных палочек судят о загрязнении водоема. Содержание кишечных палочек в воде открытых водоемов изменяется в зависимости от сезона года, количества выпадающих осадков и санитарного состояния почвенных водосбросов.

Коли-титром называют наименьший объем воды в миллилитрах или массу твердого вещества в граммах, содержащих одну кишечную палочку. Коли-индекс — количество кишечных палочек, которое содержится в 1000 мл воды или в 1 кг твердого вещества.

Определение общего числа микробов. Для определения общей бактериальной загрязненности из взятых проб в стерильных условиях делают посев на плотные питательные среды 1—0,1 мл воды (ГОСТ 5216—63). Если имеется подозрение на большую бактериальную загрязненность, то пробы воды разводят в десятикратных отношениях, аналогично разведению почвенной «болтушки», но не больше чем 1:1000. Для посева берут не менее двух разведений, выбор которых зависит от степени предполагаемой загрязненности воды. Высевают этот раствор не менее чем на две чашки из каждого разведения, которые подбирают из расчета получения на чашках не менее 30 и не более 300 колоний. Для посева вносят на дно стерильной чашки Петри 1 мл или 0,1 мл исследуемой воды и заливают расплавленным, остуженным до 45°С мясо-пептонным агаром (рН 7,2—7,4). Осторожными вращательными движениями чашки перемешивают воду с агаром. Чашки оставляют на столе до застывания агара, а затем одну чашку помещают на 24 ч в термостат при температуре 37°С, а вторую — оставляют при комнатной температуре на 48 ч.

Через 24 и 48 ч подсчитывают число колоний, вы-

росших на чашках. Для лучшей видимости можно пользоваться увеличительным стеклом ($\times 5$). При наличии на чашке более 300 колоний подсчитывают их на $\frac{1}{4}$ часть чашки, а затем пересчитывают на всю площадь.

Для определения количества бактерий, содержащихся в 1 мл исследуемой воды, среднее число колоний, выросших на двух параллельных чашках, умножают на разведение. Например, в чашках с посевом 1 мл воды, разведенной 1:100, выросло в среднем 160 колоний. Следовательно, в 1 мл исследуемой воды содержится $160 \times 100 = 16\,000$ бактерий.

Согласно требованиям, изложенным в ГОСТ 2874—54, общее число бактерий при посеве 1 мл неразбавленной воды должно быть не более 100. Вода, содержащая от 100 до 500 бактерий в 1 мл, считается сомнительной, а выше 500 — непригодной для питья. Такую воду необходимо дополнительно обеззараживать или кипятить перед употреблением.

Определение санитарно-показательных микробов (коли-титра). В соответствии с ГОСТ 5216—50 титр кишечной палочки (*E. coli*) определяется методом двухфазной бродильной пробы (метод Булижа) или ускоренным методом мембранных фильтров. Сущность его состоит в обнаружении роста кишечной палочки на жидкой среде Булижа. Этот метод очень громоздкий, требует дополнительного высева на среду Эндо и занимает много времени.

В настоящее время широкое распространение получил метод ускоренного определения коли-титра и коли-индекса с помощью мембранных нитроцеллюлозных фильтров, имеющих определенный диаметр пор. Промышленностью выпускаются пять номеров фильтров. Чем меньше номер фильтра, тем меньше диаметр пор. Для исследования воды используют фильтры № 3. Они имеют поры диаметром 0,7 мкм. Через них в течение 2,5 мин фильтруется 500 мл воды. Перед употреблением фильтры тщательно проверяют на целостность. Затем на матовой поверхности простым карандашом ставят номер исследуемого образца воды и кипятят в дистиллированной воде в течение 10—15 мин. Фильтр помещают блестящей поверхностью вниз на сетку специального фильтра Зейтца, вставленного в колбу Бунзена (рис. 61). В воронку наливают исследуемую воду

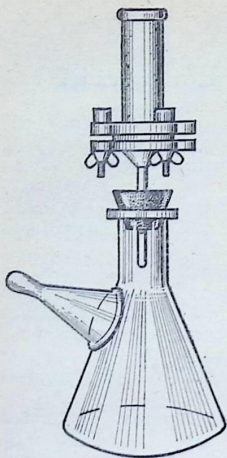


Рис. 61. Фильтр Зейтца с колбой Бунзена

и фильтруют при небольшом вакууме в колбе. После фильтрования стерильным пинцетом переносят мембранный фильтр на среду Эндо в чашку Петри. Фильтр кладут на питательный агар блестящей стороной вниз. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Через 24 ч производят подсчет колоний, выросших на фильтрах. Кишечная палочка на агаре Эндо растет в виде темно-красных с металлическим блеском или розовых с темно-красным центром колоний. Согласно ГОСТ 2874—54 в 1 мл питьевой водопроводной воды количество кишечных палочек (колоний) должно быть не более трех (коли-индекс). Коли-титр должен быть не более 300.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Стерильные чашки Петри, чашка с агаром Эндо (одна на четырех студентов), пробирки с 9 мл стерильной воды, пробирки с расплавленным агаром по 15 мл, колбы с образцами речной и прудовой воды по 100 мл, колба стерильная на 500 мл для взятия пробы воды из водопроводной сети, мембранные фильтры в стерилизаторе, пинцеты, фильтры Зейтца в сборе стерильные, посевы предыдущего занятия, микроскоп с осветителем, набор красок.

Задание. 1. Приготовить разведения из речной и прудовой воды до 1:1000.

2. Отобрать пробу воды из водопроводной сети (500 мл).

3. Произвести посев 1 мл разведенной и неразведенной водопроводной воды для определения общего числа микробов.

4. Определить коли-титр водопроводной (300 мл), речной и прудовой воды (по 10 мл из разведения 1:100).

Методические указания. Определение общего количества бактерий в воде.

Общая обсемененность («микробное число») определяется количеством микроорганизмов, выросших на МПА при глубинном посеве на чашку Петри 1 мл воды. Для этого в зависимости от степени предполагаемого загрязнения исследуемую воду разводят стерильной водопроводной водой. Обычно делают десятикратные разведения от 1:10 до 1:1000. Исследуемую воду в объеме 1 мл из соответствующего разведения, начиная с большего, вносят в стерильные чашки Петри (не менее двух) и заливают 15 мл расплавленного и остуженного до 45°С мясо-пептонного агара. Плавными движениями равномерно перемешивают содержимое на дне чашки. Чашки с застывшим агаром помещают дном вверх в термостат с температурой 37°С на 24 ч. Чистую воду «засевают» в неразведенном виде.

После инкубации производят подсчет выросших колоний с помощью лупы, отмечая каждую колонию на дне чашки чернилами или восковым карандашом. При большом количестве выросших колоний (не более 300) следует вести подсчет с помощью счетной камеры Вольфгюгеля. Число выросших колоний соответствует количеству микроорганизмов в засеянном объеме воды с соответствующего разведения. Для получения среднего арифметического числа следует сосчитать число колоний, выросших в каждой чашке, и умножить на соответствующее разведение. Результаты, подсчитанные по отдельным чашкам, сложить и затем разделить на количество засеянных чашек. Полученное число и будет являться показателем общей микробной обсемененности воды. Водопроводная вода должна иметь микробное число, не превышающее 100 (ГОСТ 2874—54).

Определение санитарно-показательных микробов (коли-титра). Нитроцеллюлозные пористые кружочки диаметром 35 мм (фильтр № 3) перед фильтрованием помещают в дистиллированную воду с температурой 50—60°С и кипятят 2—3 раза по 10—15 мин с обязательной сменой воды. Подготовленный фильтр стерильным пинцетом помещают на сетку стерильного аппарата Зейтца. После этого ввинчивают стакан аппарата и пропускают воду через фильтр, что достигается созданием вакуума в фильтровальном сосуде. В зависи-

мости от предполагаемого загрязнения фильтруют различное количество воды (от 1 до 500 мл).

По окончании фильтрации фильтр снимают стерильным пинцетом и помещают в чашку Петри на среду Эндо. Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37°С на 24 ч. На следующий день подсчитывают количество выросших на фильтре колоний кишечной палочки. Из колоний делают мазки, окрашивают их по Граму и исследуют. Для идентификации выросших колоний делают посев на глюкозо-пептонную среду Эйкмана.

При наличии помутнения и газа в среде Эйкмана дают положительный ответ. По количеству выросших колоний на фильтре судят о коли-титре. Например, на фильтре, через который профильтровано 300 мл воды, выросла одна типичная для кишечной палочки колония. Следовательно, коли-титр равен $300:1=300$, а коли-индекс — $1000:300=3,3$.

Микрофлора воздуха

Воздух является средой, неблагоприятной для развития микроорганизмов. В нем нет питательных веществ, отсутствует необходимая влага и губительно действует ультрафиолетовый спектр прямых солнечных лучей. Поэтому микрофлора воздуха весьма немногочисленна и довольно случайна. Ее видовой и количественный состав зависит от микрофлоры территории, над которой исследуется воздух. Источником микрофлоры воздуха являются почва, растительность, животные и люди. Вместе с пылью, поднимаемой потоками воздуха и ветром, а также с капельками жидкости, выбрасываемыми при дыхании и чихании, микробы могут заноситься на значительную высоту в атмосфере и, возможно, выходить за ее пределы. Наиболее загрязненными микробами являются приземные слои атмосферы. Наибольшее количество микробов содержится в воздухе над городами, содержащем много пыли. Так, над Москвой на высоте 500 м в каждом кубическом метре воздуха содержится 2000—3000 микробов, на высоте 1000 м — около 1500, а на высоте 2000 м — только 500 микробов. Однако даже в очень высоких слоях атмосферы (20 000—33 000 м) встречаются споры бацилл и плесневых грибов. По мере удаления от населенных

пунктов (над парками, полями, лесами, морями и ледниками) содержание микробов в воздухе уменьшается. В зимний период, когда почва покрыта снежным покровом, микробов в воздухе меньше, а летом, особенно в период засухи, их больше.

Бактериальная зараженность закрытых помещений (жилых комнат, производственных и общественных помещений, животноводческих построек и т. д.) всегда большая, особенно зимой, чем зараженность наружного воздуха. Объясняется это тем, что зимой человек проводит большую часть времени в помещениях, уборка и вентиляция которых не всегда соответствует санитарно-техническим нормативам. Содержание микробов в воздухе животноводческих помещений увеличивается зимой в связи с плохо устроенной вентиляцией, при раздаче запыленных кормов, при скученном содержании животных.

Большинство микробов, содержащихся в воздухе, относится к сапрофитам. Однако в нем могут находиться и патогенные для людей, животных и растений виды. Они попадают в воздух вместе с выдыхаемым воздухом в виде аэрозолей, с выделениями больных людей и животных, разносятся ветром с больных растений или их остатков. Под воздействием прямых солнечных лучей и других факторов патогенные микроорганизмы погибают в воздухе довольно быстро. Однако некоторые виды микробов, особенно защищенные высохшей белково-солевой оболочкой или частицами пыли, могут долгое время пребывать в воздухе и представлять большую эпидемическую и эпизоотологическую опасность.

Для обнаружения микробов в воздухе предложенное большое количество методов и приборов, позволяющих определять как общее количество, так и видовой состав микрофлоры. Однако ни один из предложенных способов не позволяет уловить и подсчитать всех микробов, содержащихся в анализируемой пробе воздуха, так как часть клеток не улавливается, а часть разрушается. Определение количественного и качественного состава микрофлоры воздуха проводится методами, в основу которых положены два принципа: оседание (седиментация) и засасывание (аспирация). При помощи седиментационных методов (метод Коха и др.) получают общее представление о содержащихся в воздухе микроорганизмах. Они неточны и непригодны для изучения

атмосферного воздуха, где имеют место большие колебания скорости его движения. Аспирационные методы дают возможность определить не только качественный состав, но и количественное содержание микробов в определенном объеме воздуха. Для аспирации воздуха используют различные по конструкции бактериоуловители: прибор Кротова, бактериоуловитель Речменского, прибор Дьяконова, прибор Киктенко, мембранные и растворимые фильтры.

При проведении бактериологического анализа воздуха следует стремиться к тому, чтобы число выросших колоний на чашке не превышало 150—250 при равномерном их распределении по поверхности агара. Это достигается посевом на плотные среды различных объемов жидкости, через которую просасывался воздух, или пропусканием определенных объемов воздуха.

Метод оседания (по Коху) — самый простейший метод. Он основан на оседании микроорганизмов, капелек жидкости и пылинок под влиянием силы тяжести на поверхность агара открытой чашки Петри. Однако метод не дает истинного представления о количестве содержащихся в воздухе микроорганизмов, так как на чашки плохо оседают мелкодисперсные фракции бактериальных аэрозолей и пылевых частиц. На чашки оседают главным образом крупные капельки и пылинки в закрытых помещениях или крупные частицы почвы и пыли, прибиваемые ветром к поверхности среды из атмосферного воздуха.

Метод Кротова основан на ударно-прибивном действии струи исследуемого воздуха. Он проводится с помощью прибора Кротова (рис. 62), выпускаемого отечественной промышленностью. Прибор состоит из основания, корпуса и крышки. Внутри корпуса смонтированы электромотор, центробежный вентилятор и диск-подставка для чашки Петри. В крышке прибора имеется диск из плексигласа с клиновидной щелью для просасывания воздуха. Для определения и регулирования количества пропускаемого воздуха с наружной стороны корпуса помещен ротометр. При вращении электромотора и вентилятора происходит засасывание воздуха внутрь корпуса через клиновидную щель в крышке. Струя воздуха, проходя через клиновидную щель, с большой скоростью ударяется о влажную поверхность питательной среды в чашке Петри. Скорость вращения чашки со средой

не должна превышать 60 об/мин. В результате удара находящиеся в воздухе аэрозоли, микроорганизмы, пылевые частицы и капельки жидкости прибиваются к поверхности агара и равномерно распределяются. После выращивания колоний в термостате при 37°С подсчитывают их количество и делают пересчет на содержание бактерий в 1 м³ воздуха.

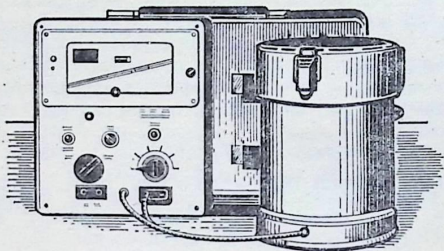


Рис. 62. Прибор Кротова

Прибор Кротова характеризуется высокой эффективностью улавливания микрофлоры в пылевой фазе аэрозоля, дает четкие результаты, прост в работе и позволяет за короткое время произвести посевы больших объемов воздуха непосредственно на чашки Петри с питательным агаром или селективной средой.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Чашки Петри со стерильным мясо-пептонным агаром, прибор Кротова.

Задание. Определить бактериальную загрязненность воздуха учебной комнаты методом седиментации по Коху и прибором Кротова (демонстрация).

Методические указания. Для определения количества микроорганизмов в воздухе по методу Коха на определенной высоте от поверхности пола каждый студент устанавливает чашку Петри с МПА. Чашки открывают полностью и выдерживают в течение 5 мин. Затем чашки закрывают и переносят в термостат с температурой

37° С на 24 ч, а затем оставляют на 48 ч при комнатной температуре. Через трое суток производят подсчет выросших колоний бактерий и грибов. По количеству колоний, выросших в чашках Петри, определяют бактериальную загрязненность воздуха.

Установлено, что за 5 мин при спокойном состоянии воздуха на площадь 100 см² оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Рассчитав площадь питательной среды в чашке и зная количество выросших на ней колоний микробов, определяют количество микроорганизмов, содержащихся в 1 м³ воздуха. Например, в чашке Петри диаметром 10 см выросло 25 колоний бактерий. Тогда площадь питательной среды равна πг²:

$$3,14 \times 5^2 = 78,5 \text{ см}^2.$$

Если на площадь 78,5 см² за 5 мин осело 25 микробных клеток, то за это же время на площадь 100 см² осело бы:

$$\begin{array}{l} 78,5 \text{ см}^2 - 25 \\ 100 \text{ см}^2 - x \end{array} \quad x = \frac{25 \times 100}{78,5} = 32 \text{ бактерии.}$$

Таким образом, за 5 мин на площадь 100 см² осело бы 32 бактериальные клетки из 10 л воздуха. Чтобы узнать количество бактерий, содержащихся в 1 м³ воздуха, составим пропорцию:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ л} - 32 \text{ бактерии} \\ 1000 \text{ л} - x \end{array} \quad x = \frac{32 \times 1000}{10} = 3200 \text{ бактерий.}$$

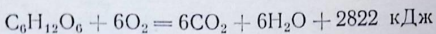
Следовательно, в 1 м³ воздуха содержится 3200 бактерий.

Глава V

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ УГЛЕРОДА

В почву ежегодно попадает большое количество органических веществ в виде остатков растений (пожнивные остатки, корни, навоз, торф, зеленые удобрения и др.), трупов животных и отмерших микроорганизмов. Под влиянием различных групп микроорганизмов эти вещества проходят сложный путь биохимических превращений, достигая в конце концов стадии минерализации. Процесс минерализации органических веществ осуществляется различными группами микроорганизмов в зависимости от элементов, составляющих органическое вещество. Образующаяся при минерализации органических веществ углекислота частично используется почвенными автотрофными и хемосинтезирующими микроорганизмами, а большая ее часть поступает в атмосферу, где она потребляется зелеными растениями в процессе фотосинтеза.

Из соединений углерода наиболее легко и быстро подвергаются минерализации углеводы — сахара и крахмал. Несколько труднее и медленнее разлагаются микроорганизмами такие углеродсодержащие вещества, как пектин, клетчатка, лигнин и жиры. Конечным результатом этих превращений является разрушение углеводов и вовлечение углерода в круговорот веществ в природе. Большое значение при этом имеют условия аэрации. В аэробных условиях распад органических углеродсодержащих соединений идет более полно и завершается обычно полным окислением с образованием конечных продуктов окисления — углекислоты и воды:

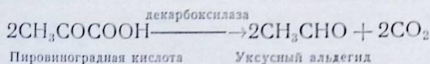


В анаэробных условиях, когда приток кислорода недостаточен, разложение углеводов протекает по типу

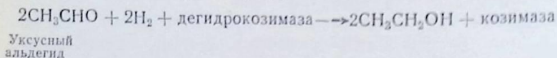
брожения, в результате которого происходит образование продуктов промежуточного распада спиртов (этиловый, бутиловый и др.) и различных кислот (молочной, масляной, уксусной, янтарной, пропионовой и др.) и выделение газообразных продуктов — метана, водорода и углекислого газа. Количество выделяемой тепловой энергии при этом процессе значительно меньше (113 кДж), чем при аэробном окислении.

Спиртовое брожение

Спиртовым брожением называется процесс анаэробного разложения углеводов под действием микроорганизмов на этиловый спирт и углекислый газ. Промежуточные продукты брожения — фосфоглицериновая, пировиноградная кислоты и уксусный альдегид, а побочные — глицерин, янтарная кислота и сивушные масла. Они состоят из амилового, бутилового и других спиртов, уксусной, масляной и других кислот и эфиров. С момента образования пировиноградной кислоты процесс разложения направляется при спиртовом брожении ферментом декарбоксилазой в сторону образования уксусного альдегида и CO_2 :



Углекислый газ, образующийся в этой реакции, является одним из конечных продуктов брожения. Накапливающийся уксусный альдегид вступает во взаимодействие с восстановленной формой козимазы — дегидрокозимазой (см. уравнение). В результате уксусный альдегид восстанавливается в этиловый спирт, а дегидрокозимаза вновь регенерируется в козимазу:



Реакция восстановления уксусного альдегида в этиловый спирт — завершающий этап брожения. Она катализируется ферментом алкогольдегидразой, коферментом которой и является козимаза.

Возбудителями спиртового брожения являются культурные (*Saccharomyces elipsoideus* и *Sacch. cerevisiae*) и дикie дрожжи (*Torula*, *Mycoderma*), а также

некоторые плесневые грибы (*Mucor*) и бактерии. В Южной Америке применяют бактерии *Ps. lindneri*, близкие к молочнокислым, но образующие в процессе брожения только этиловый спирт и углекислоту.

Культурные дрожжи представляют собой чистую культуру гриба, выделенную из диких дрожжей, по их положительным производственным качествам. Так, например, дрожжи, применяемые в пивоварении, обладают способностью хорошо осветлять пиво и придавать ему приятный вкус, винокуренные дрожжи дают высокий выход спирта, виноградные — особый букет, а хлебные — быстро размножаются, выделяют большое количество CO_2 , что способствует разрыхлению теста.

Дикие дрожжи и плесневые грибы обладают слабой бродильной способностью и образуют побочные продукты разложения, обладающие неприятным привкусом и запахом.

Дрожжевые грибы *Sacch. cerevisiae* — наиболее энергичные возбудители спиртового брожения. Это одноклеточные микроорганизмы овальной и яйцевидной формы. Размножаются дрожжи почкованием и половым путем. При половом размножении в клетках образуются шаровидные споры (рис. 63).

Вид *Schizosaccharomyces pombe* (сем. Schizosaccharomycetaceae) имеет палочковидные клетки, которые при неблагоприятных условиях попарно копулируют. Образовавшиеся при этом зиготы превращаются непосредственно в сумки с четырьмя спорами. Споры обычно эллипсоидальные, с гладкими оболочками. Этот вид выделен из африканского пива. Расы этого вида вызывают энергичное спиртовое брожение и используются в тропических и субтропических странах в бродильной промышленности.

Дрожжи спиртового брожения делятся на две расы: верхового и низового брожения. Дрожжи верхового брожения развиваются при повышенной температуре (25—28° С) и доступе кислорода. Брожение сопровождается бурным образованием газа и пены, помутнением субстрата и образованием рыхлого осадка на дне сосуда. Дрожжи низового брожения сбраживают углеводы при пониженной температуре (10—15° С) без бурого газообразования. Они не вызывают заметного помутнения бродящего субстрата, а по окончании брожения легко оседают на дно, образуя плотный осадок.

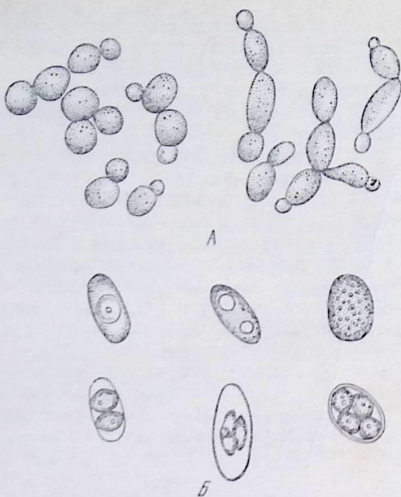


Рис. 63. Дрожжи (А) и образование у них аскоспор (Б)

Большинство дрожжей хорошо сбраживают моносахариды. Дисахариды сбраживаются только после их гидролиза на моносахариды под действием ферментов; полисахариды (крахмал) и декстрины осахариваются перед брожением с помощью солода, а древесина и клетчатка сбраживаются после предварительного гидролиза.

Спиртовое брожение нормально идет в кислой среде при рН 4,0—4,5.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Бродильные приборы, прессованные дрожжи, 10%-ный раствор сахара на 0,5%-ной пептонной воде, 10%-ный раствор щелочи (NaOH), йод кристаллический, бактериологическая петля, предметные стекла, краски, микроскоп, баритовая вода, пробирки, колба для брожения с затвором Мейсселя и клапаном Бунзена.

Задание. 1. Поставить накопительную культуру спиртового брожения.

2. Изучить морфологию дрожжевых грибков в мазках, окрашенных метиленовым синим.

3. Определить CO_2 с помощью баритовой воды.

4. Провести качественную реакцию на спирт пробой на йодоформ.

Методические указания. Для изучения спиртового брожения лучшей накопительной средой считается дрожжевая вода с виноградным сахаром. Однако можно с успехом пользоваться средой следующего состава:

Сахароза	150 г
Пептон	5 г
Калий фосфорнокислый . . .	3 г
Магний сернокислый	1 г
Вода дистиллированная . . .	1000 мл

Для постановки опыта наливают 50 мл среды в колбу емкостью 200 мл, добавляют 0,5 г измельченных пекарских дрожжей и колбу хорошо встряхивают, затем закрывают резиновой пробкой с вставленной в нее изогнутой газоотводной трубкой. Свободный изогнутый конец трубки опускают в банку или в стакан с водой и надевают на него пробирку, заполненную водой. Смонтированный таким образом прибор (рис. 64) помещают в термостат с температурой $35-37^\circ\text{C}$ на 1,5—2 ч. В результате жизнедеятельности дрожжей происходит сбраживание сахара с накоплением спирта в среде и выделением углекислого газа. Образующийся углекислый газ будет выходить через газоотводящую трубочку и собираться в пробирке, вытесняя из нее воду.

Определение углекислого газа. Образование углекислого газа дрожжами в пробирке прове-



Рис. 64. Накопительная культура спиртового брожения

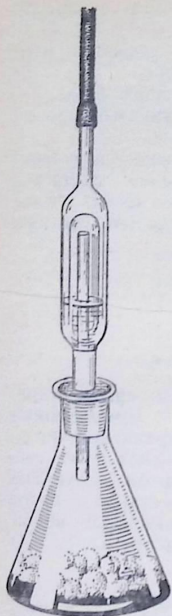
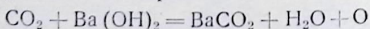


Рис. 65. Прибор для спиртового брожения с затвором Мейсселя и клапаном Бунзена

ряют по реакции, образующей углекислый барий (BaCO_2). Для этого в пробирку, заполненную бродильным газом, быстро приливают 1—2 мл барневой воды $\text{Ba}(\text{OH})_2$. В присутствии углекислого газа выпадает белый осадок углекислого бария:



Определение этилового спирта. Спирт определяют по реакции образования йодоформа. Для этого содержимое колбочки отстаивают на холоде или фильтруют через бумажный фильтр. Пипеткой переносят 5 мл фильтрата в пробирку и подщелачивают его 10%-ным раствором NaOH до слабощелочной реакции по лакмусу. Содержимое пробирки нагревают в водяной бане до 60°C и добавляют 1—2 кристаллика (около 0,1 г) кристаллического йода. Пробирку продолжают нагревать до полного растворения йода. При наличии в среде этилового спирта в присутствии NaOH происходит образование йодоформа, определяемого по характерному запаху или выпадению желтого осадка (при охлаждении).

Реакция образования йодоформа идет следующим образом:



Следует однако учитывать, что пробу на йодоформ дают и другие летучие органические вещества — ацетон и уксусный альдегид.

Определение динамики брожения по выделению CO_2 . В колбу со 100 мл стерильной среды вносят 0,5 г прес-

сованных дрожжей и закрывают пробкой, в которую вставлен затвор Мейсселя с клапаном Бунзена (рис. 65). В затвор Мейсселя наливается крепкая серная кислота. Продукты брожения проходят через кислоту затвора. Водяные пары задерживаются серной кислотой, а углекислота свободно проходит через нее и под напором выходит в клапан Бунзена. Клапан представляет собой толстостенную резиновую трубку, верхний конец которой плотно закрыт стеклянной палочкой, а боковая стенка имеет небольшой продольный разрез. При скоплении газа в трубочке стенки ее растягиваются, в разрезе образуется щель, через которую CO_2 выходит под давлением в атмосферу. Наружный влажный воздух через щель не проходит, так как она плотно смыкается.

После монтажа прибора его взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при температуре 25°С. Брожение заканчивается полностью через 3—4 дня. Колбу с содержимым ежедневно взвешивают. Разница между начальной массой прибора и массой на определенный день брожения или в конце процесса дает представление о количестве выделившейся углекислоты. По кривой уменьшения массы прибора за определенное время определяют динамику и интенсивность выделения CO_2 и процесса брожения.

Молочнокислое брожение

Молочнокислым брожением называется процесс разложения углеводов молочнокислыми бактериями с образованием преимущественно молочной кислоты.

По характеру брожения в настоящее время различают две группы молочнокислых бактерий: гомоферментативные (однотипнобродящие) и гетероферментативные (разнотипнобродящие) бактерии. Гомоферментативные бактерии образуют молочную кислоту в качестве почти единственного продукта брожения углеводов с ничтожным содержанием побочных продуктов. Гетероферментативные молочнокислые бактерии образуют всегда наряду с молочной кислотой значительные количества других продуктов, например уксусную и янтарную кислоты, этиловый спирт, углекислый газ и водород, ароматические вещества (диацетил, эфиры) и др.

Возбудители гомоферментативного брожения. Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lac-*

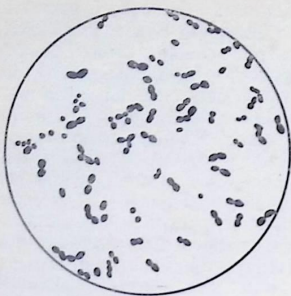


Рис. 66. *Streptococcus lactis*

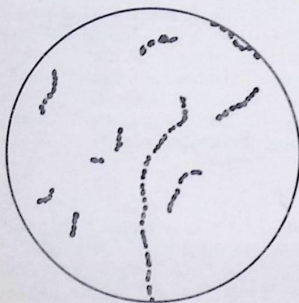


Рис. 67. *Streptococcus cremoris*

tis) — овальные кокки величиной от 0,5 до 1 мкм, располагающиеся в культуре в виде диплококков или коротких цепочек (рис. 66). По Граму красится положительно, спор не образует. Оптимальная температура развития 30—35° С. Молоко свертывается через 10—12 ч, образуя ровный, плотный сгусток. При росте на поверхности плотных питательных сред образует мелкие каплевидные колонии. Предельная кислотность молока 110—120° Т¹.

Сливочный стрептококк (*Str. cremoris*) отличается от молочнокислого тем, что его клетки располагаются в виде длинных цепочек (рис. 67). Он лучше развивается при температуре 25—30° С. В молоке образует ровный, плотный сгусток, который при разбивании имеет

сметанообразную консистенцию. Предельная кислотность, образуемая *Str. cremoris* в молоке, 110—115° Т. При культивировании в условиях сниженной температуры (15—20° С) он образует повышенное количество летучих кислот (уксусной, янтарной и др.). Этот стрептококк применяется в молочной промышленности для изготовления кисломолочного масла и сыров.

Термофильный стрептококк (*Str. thermophi-*

¹ Кислотность обычно выражают в градусах Тернера (°Т).

lus). Его клетки располагаются в виде цепочек различной длины (рис. 68). Он лучше развивается при повышенной температуре — 40—45° С. При росте на плотных средах образует округлые, зернистой структуры колонии. Предельная кислотность молока 110—115° Т.

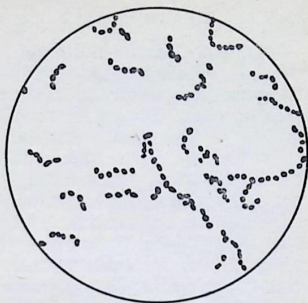


Рис. 68. *Streptococcus thermophilus*

Сырная палочка (*Lactobacterium helveticum*) — неподвижная, грамположительная, длинная палочка (до 6 мкм), соединенная в длинные цепочки. Оптимум роста 40° С, предельная кислотность 200—300° Т. Колонии мелкие, сероватые.

Болгарская палочка (*Lactob. bulgaricum*) — неподвижная, грамположительная, крупная палочка (4—5 мкм) с закругленными концами. Располагается в виде отдельных клеток и небольших цепочек. Оптимум роста 40—45° С, предельная кислотность молока 200—300° Т. Колонии крупные, волнистые.

Ацидофильная палочка (*Lactob. acidophilum*) — неподвижные, грамположительные палочки различной длины (4—5 мкм). Оптимум роста при 37° С, предельная кислотность 200—250° Т. Применяется для производства ацидофильного молока.

Огуречная палочка (*Lactob. cucumeris*) — короткие, грамположительные, неподвижные палочки, сцепленные парами или цепочкой. Оптимум развития при 20—25° С. Встречается обычно в рассоле при квашении овощей и в силосе.

К группе молочнокислых бактерий относятся *Lactob. casei*, играющая большую роль в созревании сыров, *Lactob. plantarum*, принимающая участие в молочнокислом брожении, происходящем при квашении овощей и силосовании кормов.

Возбудители гетероферментативного брожения. Наиболее часто встречаются капустная палочка — *Lactob. brassicae fermentatae* и кишечная палочка *E. co-*

li, *Betabacterium breve*, *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextranicum*.

Молочнокислые бактерии довольно хорошо изучены, так как с давних пор используются человеком в его практической деятельности при изготовлении молочнокислых продуктов, при силосовании кормов, квашении овощей и др. Они обеспечивают консервирование продуктов за счет накопления молочной кислоты, подавляющей развитие гнилостной микрофлоры. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они встречаются на листьях, стеблях, цветах, плодах, семенах и на корнях растений. Количество их колеблется от единиц до нескольких десятков тысяч на 1 г зеленой массы растений. Содержание молочнокислых бактерий на растениях зависит от вида растения, фазы его развития, места и условий произрастания. Молочнокислые бактерии прикорневой зоны способствуют превращению трехкальциевого фосфата почвы в воднорастворимую, усваиваемую растениями форму.

Растения и почва являются источниками, из которых молочнокислые бактерии попадают в молоко и другие продукты. Молочнокислые бактерии широко используются в молочном производстве, в хлебопечении, в процессах квашения овощей и силосования кормов для скота, при изготовлении кваса и обработке меховых шкурок, в производстве молочной кислоты и т. д.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Капустный рассол в пробирках по 5 мл, молоко в колбочках по 50 мл, закваска в пробирках по 5 мл, 1%-ный раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор едкого натра, градуированные пипетки на 1 мл, бюретка для титрования, силос, стерильная вода в пробирках и колбах, чашки с МПА, БПА, сусло-агаром с мелом, картофельная среда.

Задание. 1. Определить кислотность молока по Тернеру.

2. Поставить накопительную культуру молочнокислых бактерий.

3. Изучить морфологию молочнокислых бактерий в мазке, приготовленном из рассола капусты и из смыва силоса.

Методические указания. Лучшей питательной средой для молочнокислых бактерий является цельное или обезжиренное молоко (обрат).

Парное молоко содержит некоторое количество молочной кислоты, которая обуславливает начальную кислотность молока.

Кислотность парного молока может колебаться от 10 до 25° Т. Поэтому перед постановкой опыта необходимо установить исходную (начальную) кислотность молока, используемого в качестве питательной среды.

Определение кислотности молока. Кислотность определяют методом титрования молока 0,1 н. раствором едкого натра при индикаторе фенолфталеине.

Для титрования берут в колбочку 10 мл молока, разбавляют двойным объемом дистиллированной воды и прибавляют 2—3 капли 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина. Смесь хорошо перемешивают и титруют из бюретки 0,1 н. раствором едкого натра до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 2 мин. Количество щелочи, пошедшее на нейтрализацию 10 мл молока, умножают на 10 (для расчета на 100 мл молока). Полученная величина показывает кислотность молока в градусах Тернера. Градусы Тернера показывают количество миллилитров 0,1 н. раствора едкого натра, пошедшего на нейтрализацию кислотности 100 мл молока. 1° Тернера соответствует 9 мг молочной кислоты.

Постановка опыта. В колбочку емкостью 100 мл наливают 50 мл свежего молока после определения начальной кислотности. К молоку добавляют закваску из чистых культур молочнокислых или ацидофильных бактерий или кислого молока из расчета 1 мл на 10 мл среды. Колбы закрывают ватными пробками, помещают в термостат с температурой 30—35° С на 10 ч для развития молочнокислых бактерий. При гомоферментативном брожении в колбочке образуется плотный сгусток молока. После образования сгустка приступают к изучению морфологии бактерий в окрашенных мазках и определению молочной кислоты, накопившейся в пробе под влиянием развившихся бактерий.

Для изучения морфологии молочнокислых бактерий на чистое предметное стекло петлей наносят каплю молочной сыворотки или прокисшего молока, смешивают ее с каплей стерильной воды и готовят мазок. Мазок высушивают, фиксируют спирт-эфиром или в пламени горелки и обезжиривают легким прикосновением к го-

рячему мазку фильтровальной бумагой. Мазок окрашивают в течение 3—5 мин метиленовым синим, промывают водой, высушивают и исследуют иммерсионным объективом. В препарате должны преобладать те микроорганизмы, которые были взяты в качестве закваски.

Определение конечной кислотности молока. Количество молочной кислоты, накопившейся в молоке, можно определить по градусам Тернера. Для этого в колбу берут 1 мл скисшего молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и по ранее описанной методике определяют кислотность (конечную). Результат титрования умножают на 100. Из полученного числа вычитают исходную кислотность. Остаток будет показывать кислотность в градусах Тернера, образовавшуюся в результате деятельности микроорганизмов. По этой кислотности можно рассчитать количество накопившейся молочной кислоты, зная, что 1°T равен 9 мг кислоты.

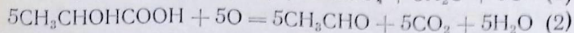
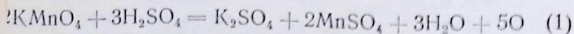
Например. Исходная кислотность 22°T , а конечная 180°T . Тогда микроорганизмами накоплено $180 - 22 = 158^{\circ}\text{T}$, или $159 \times 9 = 1422$ мг молочной кислоты на 100 мл молока.

Из качественных реакций на молочную кислоту наиболее надежными и специфическими являются:

- 1) перевод молочной кислоты в уксусный альдегид и
- 2) реакция с тиофеном.

Для проведения качественной пробы на молочную кислоту прокисшее молоко отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр. Для исследования берут фильтрат.

Определение уксусного альдегида. К 10 мл исследуемого фильтрата прибавляют 1 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Смесь нагревают до кипения и добавляют к ней несколько капель 2%-ного раствора KMnO_4 . В этих условиях происходит окисление молочной кислоты и образование уксусного альдегида. Реакция протекает следующим образом:



Уксусный
альдегид

Уксусный альдегид обнаруживается по реакции с аммиачным раствором азотнокислого серебра. Для

этого горлышко колбы или пробирки закрывают фильтровальной бумагой, смоченной 10%-ным аммиачным раствором азотнокислого серебра. При нагревании смеси уксусный альдегид улетучивается и, взаимодействуя с аммиачным раствором азотнокислого серебра, вызывает его разложение. Фильтровальная бумага чернеет.

Реакция с тиофеном. В пробирку наливают 1—2 мл исследуемого фильтрата, прибавляют к нему 5 мл крепкой серной кислоты и 0,5 мл насыщенного раствора медного купороса (CuSO_4). Смесь хорошо взбалтывают и нагревают в течение 5 мин на водяной бане при 100°C . После охлаждения прибавляют к смеси несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора тиофена. В присутствии молочной кислоты получается вишнево-красное окрашивание. Реакция очень чувствительна и специфична.

Микробиологическое исследование силоса. Силос — прекрасный, высокопитательный, витаминный корм для всех видов травоядных животных. Потери сухих веществ растений при правильном силосовании не превышают 10—15%. В нем сохраняются листья, цветки и мелкие побеги, т. е. части растений, которые содержат наибольшее количество питательных веществ.

В основе силосования лежит молочнокислое брожение. В процессе силосования сахар растений под влиянием ферментов молочнокислых бактерий сбраживается в молочную и частично в уксусную кислоты. Эти кислоты препятствуют развитию маслянокислых и гнилостных бактерий, грибов.

Нормальное силосование протекает в анаэробных условиях при достаточном содержании сахара в силосующихся растениях, невысоком содержании белка и солей. Белок и соли растений представляют собой буферную систему, которая нейтрализует часть молочной кислоты за счет связывания ионов водорода. Таким образом, силосуемость растений определяется не только количеством содержащегося сахара, но и содержанием специфических буферных систем. Поэтому при силосовании растений необходимо учитывать «сахарный минимум» — наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, чтобы сместить рН силосуемого растительного сырья до 4,0.

Растения силосуются хорошо, если в них сахара много, а сахарный минимум небольшой. Если фактическое содержание сахара в растениях примерно равняется сахарному минимуму (за счет большого содержания буферных систем — белка и солей), то они силосуются плохо. При содержании сахара меньше сахарного минимума растения не силосуются. Хороший силос имеет зеленый цвет, ароматичный, хлебный или слабокислый запах, питательные вещества в нем находятся в легко усвояемой форме за счет частичного ферментативного гидролиза или сбраживания. Общая кислотность такого силоса не превышает 2—2,5%, рН около 4—4,2, влажность 70—75%. В составе его микрофлоры содержатся в основном молочнокислые палочки и молочнокислые стрептококки. В небольшом количестве в нем встречаются дрожжи.

При нарушении режима силосования, снижении кислотности до 4,7 и ниже и при доступе кислорода воздуха к силосуемой массе в ней развиваются маслянокислые и гнилостные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. За счет развития этих групп микроорганизмов в силосе накапливаются масляная кислота, амины, аммиак и другие дурно пахнущие, обладающие неприятными вкусовыми свойствами и даже токсические вещества. Такой силос низкого качества, плохо поедается животными и может приводить к желудочно-кишечным заболеваниям.

Целью микробиологического исследования силоса является определение качественного и количественного состава микроорганизмов в силосе, выявление микробов, вызывающих порчу силоса — маслянокислых и гнилостных бактерий, грибов, дрожжей. Исследование силоса рекомендуется проводить в течение суток с момента взятия пробы.

Определение качественного состава микроорганизмов. Пинцетом берут кусочек силоса и плотно прижимают его к обезжиренному предметному стеклу — делают мазок-отпечаток. Препарат высушивают, фиксируют на пламени и окрашивают по Граму или метиленовым синим, микроскопируют с иммерсией. В препаратах из хорошего силоса преобладают короткие, тонкие неспороносные палочки — молочнокислые бактерии и небольшое количество дрожжевых кле-

ток. В плохом силосе часто обнаруживаются споровые бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

Определение общего количества микроорганизмов в силосе.

Для анализа берут 1 г свежего силоса и помещают его в колбу с 99 мл стерильной воды. Колбу встряхивают на качалке в течение 10—15 мин. После непродолжительного отстаивания (2—3 мин) из колбы берут стерильной пипеткой и переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды 1 мл жидкости. Готовят ряд последовательных разведений от 1:100 до 1:10 000 000. Из приготовленных разведений (из 5—7 пробирок) делают посевы на плотные питательные среды. Для выявления общего количества микробов посев делают на бобово-пептонный агар. Количество гнилостных бактерий определяют в посевах на мясо-пептонном агаре, молочнокислых — на сусло-агаре с мелом, а дрожжи и грибы — на сусло-агаре или среде Чапека.

Чашки с посевами выдерживают в термостате при 35° С. Через 3—4 сут производят подсчет выросших колоний и определяют, какие группы бактерий являются преобладающими. Колонии молочнокислых бактерий определяют по зонам растворения мела в питательном сусло-агаре. В 1 г хорошего силоса содержится около 1 млн. молочнокислых бактерий.

Количество маслянокислых бактерий определяют на картофельной среде с мелом или на агаре Рушмана (смесь равных частей картофельного агара с мелом и морковного агара). Перед высевом на эти среды пробирки с нужным разведением прогревают 15 мин на водяной бане при 80—90° С. Чашки с посевами выдерживают в термостате при 26—30° С. Учет количества выросших колоний производят через 24 ч три раза.

Подсчет общего количества микроорганизмов, содержащихся в силосе, можно проводить в камере Горяева из разведения 1:100. Из этого же разведения можно делать мазок для учета кокковых и палочковидных бактерий.

Маслянокислое брожение

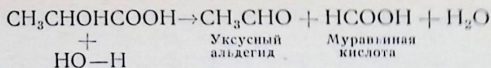
Маслянокислое брожение — очень сложный процесс превращения углеводов в анаэробных условиях с образованием масляной кислоты и других продуктов.

Возбудителями маслянокислого брожения является большая группа анаэробных спороносных палочек длиной от 4,0—5,0 до 7,0—12 мкм, толщиной от 0,5 до 1,5 мкм, называемых *Clostridium*. Они встречаются во всех пробах почвы, в илистых отложениях озер, прудов и загрязненных рек, в растительных отбросах и остатках, в навозе, молоке, на поверхности растений. В процессе спорообразования бактериальная клетка приобретает форму веретена или барабанной палочки. В протоплазме маслянокислых бактерий содержится гранулеза, дающая с йодом бурую или голубую окраску.

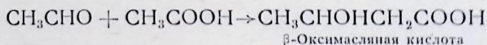
Маслянокислые бактерии способны сбраживать не только простые сахара, но и более сложные углеводы — декстрин, крахмал, пектиновые вещества, глицерин, маннит, органические кислоты (молочная, пировиноградная) и их соли. В качестве источника азота они могут использовать белки и продукты его распада, аммонийный азот (при наличии витаминов) и даже свободный азот атмосферы.

Масляная кислота в небольших концентрациях является физиологическим стимулятором роста растений.

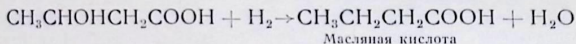
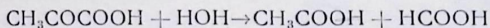
Химизм маслянокислого брожения очень сложен и недостаточно полно изучен. По данным В. Н. Шапошникова, процесс образования идет в две фазы и оказывается связанным с образованием уксусной кислоты из пировиноградной и последующим вовлечением в реакцию молочной кислоты. В первую фазу брожения молекула гексозы, подвергаясь фосфорилированию, превращается в дифосфорный эфир фруктозы. Этот эфир распадается на две фосфотриозы, которые через фосфоглицериновый альдегид и глицериновую кислоту превращаются в начале развития культуры (за счет дополнительного окисления, связанного с потреблением водорода конструктивным обменом) в пировиноградную и дальше — в уксусную кислоту. Во второй фазе происходит некоторое торможение темпа развития клеток, а следовательно, и потребления водорода в конструктивных процессах. В силу этого вместо пировиноградной кислоты образуется более восстановленная молочная кислота, которая подвергается декарбоксилированию с образованием муравьиной кислоты и уксусного альдегида:



Уксусный альдегид вступает в реакцию конденсации с образовавшейся из пировиноградной уксусной кислотой:



Образовавшаяся β-оксимасляная кислота восстанавливается в масляную за счет окисления новой молекулы пировиноградной кислоты в уксусную:



В процессе брожения наряду с масляной кислотой образуется ряд побочных продуктов: уксусная, пропионовая, капроновая, муравьиная и другие кислоты; этиловый, бутиловый, амиловый и пропиловый спирты, водород и углекислота.

Возбудители маслянокислого брожения. Типичными представителями маслянокислых бактерий являются *Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. felsineum*.

Cl. butyricum. В молодой культуре подвижная, крупная палочка (длина около 10 мкм, толщина 0,5—1 мкм). В более поздние стадии развития теряет подвижность, внутри клетки (чаще ближе к одному концу) образуется крупная спора. Стенка клетки растягивается, и спора принимает вид веретена или барабанной палочки. Сбраживает углеводы с образованием большого количества масляной кислоты.

Cl. pasteurianum. В молодой культуре имеют вид прямых палочек с закругленными концами. Длина палочек 2,5—7,5 мкм, толщина 0,5—1,0 мкм. Подвижные, расположены одиночно или парами. В старых культурах плазма клеток становится зернистой, ближе к одному из концов образуется спора. Этот конец утолщается, и палочка принимает вид сигары или веретена с одним более острым концом (рис. 69). Эта палочка активно фиксирует азот атмосферы.

Cl. felsineum. В молодой культуре имеют вид палочек длиной 2—5 мкм, толщиной около 1 мкм. При спорообразовании клетки утолщаются с одного конца и принимают грушевидную форму. В протоплазме клеток накапливается большое количество гранул. Ак-

тивно разлагает пектин с образованием масляной кислоты.



Рис. 69. *Clostridium pasteurianum*

Для обнаружения маслянокислых бактерий в почве делают посев на различные среды. Лучшими из них являются: жидкая картофельная среда, картофельный агар с мелом и смесь равных частей картофельного и морковного агара.

Картофельная среда. Сырой картофель очищают от кожуры и глазков, моют, варят. Го-

рячий картофель растирают в ступке и смешивают с отварной водой из расчета 200 г картофеля на 1000 мл отвара. К смеси добавляют 2% мела, хорошо перемешивают и разливают при постоянном помешивании в узкие высокие пробирки. Среду стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин. После стерилизации в пробирках должно быть равное количество воды и картофеля. Для улавливания газа в пробирки перед стерилизацией опускают вверх дном специальные пробирочки-поплавки.

Картофельный агар. Сырой картофель чистят, моют, нарезают ломтиками и отваривают из расчета 100 г картофеля на 1 л воды. Отвар фильтруют через марлю. К фильтрату добавляют 2% агара и кипятят до его растворения. Добавляют к среде 2% мела, хорошо перемешивают и разливают по пробиркам (на $\frac{2}{3}$ объема) при непрерывном помешивании. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

Микроорганизмы маслянокислого брожения очень чувствительны к кислоте. Для нейтрализации кислоты

к питательным средам приходится прибавлять 2—5% мела.

В природе это брожение имеет большое значение как звено в цепи бесконечных превращений веществ. В народном хозяйстве маслянокислые бактерии приносят значительный ущерб, вызывая порчу картофеля и овощей, вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов и силоса.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Широкие пробирки с резиновыми пробками, несколько клубней картофеля, скальпели, пинцеты, мел в порошке, водяная баня, жидкая картофельная среда, картофельный агар (расплавленный), почва.

Задание. 1. Определить кислотность молока по Тернеру в посевах предыдущего занятия.

2. Рассчитать количество накопившейся молочной кислоты.

3. Определить содержание молочной кислоты в молоке по уксусному альдегиду.

4. Приготовить, окрасить метиленовым синим и посмотреть мазок из культур молочнокислых бактерий.

5. Поставить накопительную культуру маслянокислых бактерий.

Методические указания. Хорошее развитие типичных маслянокислых бактерий удается получить на среде с картофелем. Для этого сырой очищенный картофель нарезают скальпелем тонкими длинными ломтиками. Несколько ломтиков картофеля помещают в широкие стерильные пробирки, в которые предварительно насыпают 0,5—1 г мела. Затем в пробирки наливают на $\frac{2}{3}$ объема водопроводной воды и помещают в водяную баню с температурой 80° С, где выдерживают 15—20 мин или кипятят 5—10 мин. Большинство вегетативных форм микроорганизмов, содержащихся на картофеле, за это время погибает, а споры маслянокислых бактерий остаются жизнеспособными.

Пробирки с содержимым закрывают пробками и помещают в термостат с температурой 30° С. Через 3—5 сут в пробирках развивается маслянокислое брожение: ломтики картофеля всплывают кверху, на поверхности среды появляются пузырьки газа и образуется пена; поплавки, если они были опущены в среду, заполняют-

ся газом и всплывают; при открывании пробирки ощущается запах масляной кислоты. В глубине агара развиваются колонии маслянокислых бактерий. Под влиянием образующихся газов агар в пробирках разрывается на части.

В это время производится микроскопическое изучение возбудителей маслянокислого брожения и качественное определение продуктов брожения.

Микроскопическое изучение маслянокислых бактерий проводят в раздавленной капле. Для этого пастеровской пипеткой набирают из глубины жидкость и капают на предметное стекло. К 1 капле жидкости прибавляют 1 каплю раствора Люголя и покрывают покровным стеклом, затем препарат помещают на столик микроскопа и изучают сухим объективом $\times 40$ при опущенном конденсоре. В большинстве случаев в препаратах обнаруживается *Cl. pasteurianum* — крупные, подвижные палочки, с заостренными концами или с булавовидно-утолщенным одним концом (споровая форма). В местах утолщения клетки можно заметить овальное тельце — спору, сильно преломляющую свет. В местах скопления гранулы просматриваются бурые или голубовато-синие включения.

Качественные реакции на масляную кислоту. 1. Реакция образования масляно-этилового эфира. К 5 мл питательной жидкости, после роста маслянокислых бактерий прибавляют 0,5 мл 96% спирта и 1—2 мл крепкой серной кислоты. Смесь хорошо взбалтывают и нагревают. Образующийся масляно-этиловый эфир определяется по характерному запаху, напоминающему запах анагаса.

Реакция идет по уравнению



2. Реакция с хлорным железом. К 5 мл исследуемой жидкости, содержащей соли масляной кислоты, добавляют 2 мл 5%-ного раствора хлорного железа. Пробирку встряхивают и нагревают. Вследствие образования маслянокислого железа жидкость в пробирке приобретает коричневое окрашивание.

Брожение пектиновых веществ

Пектины являются главной частью межклеточного вещества, цементирующего растительные клетки в ткани. Химический состав их различен у разных видов растений. Это сложные полисахариды, состоящие из частиц галактуроновой кислоты, соединенных в длинные цепочки. Различают три типа пектиновых веществ: 1) протопектин — входит в состав клеточной стенки (водонерастворим); 2) пектин — межклеточное водонерастворимое вещество; является полимером галактуроновой кислоты, содержащим метилэфирные связи; 3) пектиновая кислота — водорастворимый полимер галактуроновой кислоты, не содержащей метилэфирных связей.

Разложение пектиновых веществ представляет собой усложненный тип маслянокислого брожения. Под влиянием фермента протопектиназы протопектин разлагается с образованием растворимого пектина. Выделяемая бактериями пектинметилэстераза гидролизует метилэфирные связи с образованием пектиновой кислоты и метилового спирта. Пектин и пектиновая кислота расщепляются ферментом полигалактуронидазой на более мелкие структурные образования: галактуроновую кислоту, галактозу, ксилозу, арабинозу, уксусную кислоту и метиловый спирт. В дальнейшем происходит расщепление этих компонентов по типу маслянокислого брожения с образованием уксусной, масляной и муравьиной кислот, этилового и бутилового спиртов, CO_2 и H_2 .

Большинство возбудителей брожения пектиновых веществ относится к факультативно-анаэробным, спорообразующим, подвижным формам. Наиболее активными из них являются *Cl. felsineum*, *Cl. pectinovorum*, *Cl. haumani*.

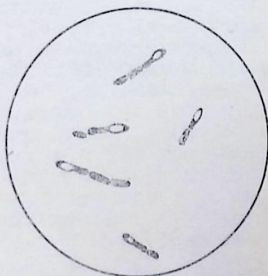


Рис. 70. *Clostridium felsineum*

Cl. felsineum Carbone (рис. 70). Подвижные палочки длиной 3,5—5 мкм, толщиной около 1 мкм. Споры образуются субтермально. Клетка при этом приобретает сигарообразную или грушевидную форму с заостренными концами. В протоплазме клеток накапливается большое количество гранулезы. В процессе брожения образуется масляная, уксусная, муравьиная и молочная кислоты, бутиловый и этиловый спирты, ацетон.

Cl. pectinovorum Winogradsky. Крупные, подвижные, грамположительные палочки длиной до 15 мкм, диаметром 1—1,5 мкм. Споры крупные, овальной формы, расположены терминально. При полностью сформированной споре клетка имеет булавовидную форму. В протоплазме клеток при спорообразовании накапливается большое количество гранулезы. При сбраживании пектина образуется большое количество масляной и уксусной кислот, CO_2 и H_2 , а также некоторое количество молочной кислоты, этилового и изопропилового спиртов.

Cl. hautmani. Подвижные грамположительные палочки длиной от 3 до 12 мкм, толщиной около 1 мкм. Крупная округлая спора образуется на конце палочки. Клетка приобретает вид ракетки. Биохимическая активность мало изучена.

Из аэробных микроорганизмов наибольшее значение в разложении пектиновых веществ имеют *Pectinobacter amylovorum*, грибы из родов *Cladosporium*, *Alternaria* и актиномицеты.

В природных условиях пектиновое брожение имеет большое значение в разложении растительных остатков. В народном хозяйстве оно используется для отделения от коровой паренхимы и древесных частей стебля растений лубяных волокон, идущих на изготовление ниток. Для этих целей применяется водяная или росяная мочка прядильных растений — льна, конопли, кенафа, джута и др.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп, предметные и покровные стекла, льняная соломка или снопики из нее, ножницы, пинцеты, нитки, скальпели, раствор Люголя, длинные, широкие пробирки, водяная баня.

Задание. 1. Приготовить мазки, окрасить их по Граму и изучить морфологию маслянокислых бактерий.

2. Провести качественные реакции на обнаружение масляной кислоты.

3. Поставить накопительную культуру возбудителей брожения пектиновых веществ.

Методические указания. Из льняной соломки готовят снопики и перевязывают их ниткой в двух местах. Длина снопика должна быть в пределах 5—6 см. Снопик опускают в широкую, длинную пробирку, заливают водопроводной водой и кипятят 1—2 мин. Воду сливают, снопик заливают новой порцией воды и снова кипятят. Воду опять удаляют, а снопик снова заливают водой на $\frac{3}{4}$ объема пробирки и добавляют небольшое количество мела (1%). Содержимое пробирки вновь кипятят. При кипячении убивается содержащаяся на растениях и в воде микрофлора и удаляются из растительного экстрактивные вещества, мешающие брожению пектина.

После кипячения в снопик вставляется пинцетом соломка некипяченого льна для заражения.

Пробирки закрывают ватной пробкой и помещают в термостат с температурой 25—30° С на 6—7 сут. Уже в первые сутки на поверхности жидкости появятся пузырьки газа и образуется пена. Это так называемое пенное брожение, обусловленное сбраживанием моносахаров под действием молочнокислых бактерий и кишечной палочки. Через 4—5 дн начинают размножаться *Cl. pectinovorum*, а затем более кислотоустойчивые *Cl. felsineum*. Под действием ферментов этих микроорганизмов пектиновые вещества паренхимы коры расщепляются, пучки волокон отделяются от коры и древесины. Процесс заканчивается через 1,5—2 недели. Снопики при этом тонут на дно.

При брожении пектиновых веществ образуется масляная кислота. Ее накопление наряду с уксусной кислотой, образующейся при гидролизе пектина, можно обнаружить с помощью тех же реакций, которые применяются для обнаружения масляной кислоты (проба с хлорным железом, получение ананасовой эссенции).

Микроскопическое исследование возбудителей пектинового брожения. После окончания брожения (через 1—2 недели с момента опыта) вынимают из пробирки снопик, разрезают нитку и берут одну или несколько соломинок для исследования. Из соломинок отжимают на предметное стекло неболь-

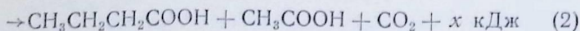
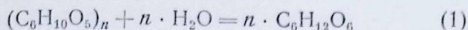
шое количество жидкости или делают разрез соломинок. С внутренней поверхности соломки производят соскоб острым скальпелем на предметное стекло. К капле жидкости или соскоба добавляют каплю раствора Люголя, покрывают покровным стеклом (готовят раздавленную каплю) и исследуют под микроскопом. Возбудители брожения пектиновых веществ будут окрашены йодом в синий цвет и хорошо видны в виде длинных палочек со спорой на конце. Степень разрушения пектиновых веществ легко устанавливается после высушивания снопиков по легкости отделения целлюлозных волокон от высушенного стебля.

Анаэробное разложение клетчатки

Клетчатка (целлюлоза) представляет собой сложный полисахарид $(C_6H_{10}O_5)_n$, являющийся главным составным элементом оболочек растительных клеток. К этой группе веществ относятся гемицеллюлозы и лигнин, являющиеся компонентами межклеточного вещества.

Громадное количество клетчатки в виде растительных остатков и отходов попадает в почву и водоемы, где подвергается биологическому расщеплению под действием ферментов анаэробных бактерий, актиномицетов и плесневых грибов.

Под влиянием фермента целлюлазы, находящейся на поверхности клеток микробов, клетчатка гидролизуетсЯ с образованием промежуточных соединений типа глюкозы и целлобиозы. Последняя под действием фермента целлобиазы переходит в глюкозу, которая подвергается дальнейшим превращениям по типу маслянокислого брожения с образованием масляной, уксусной, янтарной, молочной и муравьиной кислот, водорода, углекислого газа и иногда спирта, с освобождением небольшого количества энергии. Процесс последовательного расщепления клетчатки можно выразить следующими уравнениями:



В накопительной культуре помимо указанных продуктов брожения обнаруживается метан (CH_4). Ранее считали, что он является продуктом брожения целлюлозы под действием ферментов специальных метановых бактерий. В настоящее время установлено, что метан является продуктом распада кислот, возникших при сбраживании целлюлозы.

Возбудителями анаэробного разложения клетчатки являются мезофильные и термофильные микроорганизмы, относящиеся в своем большинстве к роду *Clostridium*.

Cl. cellulosa Omelianskii. Подвижные, грамотрицательные палочки длиной от 4 до 8 мкм, диаметром около 0,5 мкм. В старых культурах палочки сильно удлинняются и имеют вид тонких нитей. На конце клетки образуется шаровидная спора, значительно превосходящая по ширине клетку. Такая клетка со спорой похожа на барабанную палочку (рис. 71). Гранулеза в клетках отсутствует.



Рис. 71. *Clostridium cellulosa* Omelianskii

Cl. thermocellum и *Cl. thermocelluloseum* представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки с округлой спорой на конце. По Граму не окрашиваются. Оптимум роста при температуре 55—56° С, рН 7,0—7,2. При сбраживании целлюлозы накапливают сахара, уксусную кислоту, этиловый спирт, H_2 и CO_2 .

Целлюлозолитические анаэробные микроорганизмы распределены повсеместно. Они всегда обнаруживаются в почвах, особенно окультуренных, удобренных органическими удобрениями, в воде, в иле прудов и других водоемов, в рубце жвачных животных. В рубце жвачных постоянно поддерживаются благоприятные температурные условия и рН среды. Целлюлозолитические

бактерии в рубце расщепляют клетчатку до усвояемых животными форм. Кроме того, они синтезируют белок и витамины, служащие дополнительным источником питания животных.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Конические колбы с питательной средой и газоотводными трубками, фильтровальная бумага, ножницы, микроскоп, краски, стекла, почва, водяная баня.

Задание. 1. Изучить морфологию бактерий и химизм процесса брожения пектиновых веществ.

2. Поставить накопительную культуру возбудителей анаэробного разложения клетчатки.

Методические указания. Для обнаружения в почве возбудителей анаэробного разложения клетчатки используют питательную среду Омелянского следующего состава:

Мясо-пептонный бульон	300 мл
Вода водопроводная	700 мл
Аммоний фосфорнокислый	1,0 г
Калий кислый фосфорнокислый	1,0 г
Магний сернокислый	0,5 г
Натрий хлористый	0,1 г
Мел	2,0 г
Железо сернокислое	2 капли 1%-ного раствора

Среду стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

Высокие пробирки или небольшие колбы наливают на $\frac{2}{3}$ питательной средой. Добавляют к ней 0,5—1 г исследуемой почвы. Содержимое кипятят 5 мин для уничтожения бесспоровых форм микроорганизмов.

После кипячения в пробирку кладут несколько полосок фильтровальной бумаги, доливают стерильной питательной средой доверху и закрывают пробкой с газоотводной трубкой или затвором. Свободный конец трубки помещают в стакан с водой. Прибор помещают в термостат при температуре 30—35° С. По мере развития брожения фильтровальная бумага желтеет и покрывается слизью. Через 1,5—2 недели полоски

фильтровальной бумаги полностью распадаются на отдельные волокна.

По истечении указанного срока среду подвергают микроскопическому и химическому исследованию. Для микроскопического исследования готовят мазок, окрашивают его фуксином и исследуют. Возбудители анаэробного разложения клетчатки имеют вид слегка изогнутых длинных палочек с крупной спорой на конце.

Химическое исследование проводят в целях обнаружения продуктов распада клетчатки — этилового спирта, масляной и уксусной кислот.

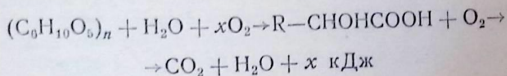
Аэробное разложение клетчатки

Большое количество клетчатки находится в поверхностных хорошо аэрируемых слоях почв. Здесь она разлагается аэробными микроорганизмами, вовлекаясь в общий круговорот углерода в природе. Особенно много аэробных организмов, разлагающих клетчатку, в окультуренных пахотных почвах, удобренных навозом.

Общая схема аэробного разложения клетчатки сводится к тому, что под влиянием фермента целлюлазы, выделяемого микроорганизмами, происходит гидролиз клетчатки до образования водорастворимых углеродистых соединений, возможно сахаров. Последние в присутствии молекулярного кислорода окисляются в оксикислоты, которые окисляются до конечных продуктов с выделением большого количества свободной энергии:



Рис. 72. *Cytophaga*



Образующиеся оксикислоты являются хорошим энергетическим материалом для группы азотфиксирующих бактерий почвы, а уроновые кислоты участвуют в образовании гумуса.

В аэробном разложении клетчатки принимают участие многие виды плесневых грибов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Fusarium*), актиномицеты и бактерии. Наиболее энергичными разрушителями клетчатки являются бактерии.

Cytophaga (порядок *Myxobacteriales*). Изогнутые подвижные грамотрицательные палочки с заостренными концами ($4-6 \times 0,5$ мкм). При старении они превращаются в круглые или овальные цисты (рис. 72). Окрашивают клетчатку в оранжевый цвет.

Cellvibrio. Мелкие ($2-4 \times 0,5$ мкм), слегка изогнутые грамотрицательные палочки, на одном из концов которых находится длинный жгутик. При помощи этого жгутика осуществляются быстрые поступательные движения вибрионов. При разложении клетчатки образуют желтый или зеленый пигмент.

Cellfalcicula. Мелкие ($2-3 \times 0,3$ мкм) веретенообразные или серповидные, грамотрицательные палочки, с заостренными концами и полярно расположенным жгутиком. На фильтровальной бумаге образуют пятна зеленого цвета.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Колбы плоскодонные на 150—200 мл с ватными пробками, питательная среда, круглые бумажные фильтры (большие), пинцеты, ножницы, почва.

Задание. 1. Поставить накопительную культуру возбудителей аэробного разложения клетчатки.

Методические указания. Для постановки накопительной культуры возбудителей аэробного разложения клетчатки лучшей считается минеральная среда Гетчинсона (рН 7,2—7,3):

Калий кислый фосфорнокислый	1,0 г
Кальций хлористый	0,1 г
Магний сернокислый	0,3 г
Натрий хлористый	0,1 г
Железо хлористое	0,01 г

Натрий азотнокислый	2,5 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

В колбу емкостью 150—200 мл наливают тонким слоем (не выше 1 см) питательную среду, вносят в нее 0,5—1,0 г почвы и немного мела (на кончике шпателя). На дно колбы опускают сложенный конусом со складками фильтр широкой стороной вниз. Вместо конических фильтров можно пользоваться сложенной в «гармошку» фильтровальной бумагой, положенной на дно колбы (рис. 73). Колбы закрывают ватной пробкой и ставят в термостат с температурой 25—26° С на 10—14 сут.

Энергичное разрушение бумаги происходит на границе жидкости, где диффузия кислорода и питательных солей к фильтровальной бумаге обеспечивает микроорганизмам наилучшие условия питания и дыхания.

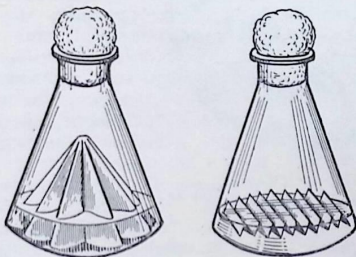


Рис. 73. Накопительные культуры аэробного разложения клетчатки

Бумага в этом месте покрывается желтоватыми или оранжевыми пятнами за счет развития пигментных бактерий, становится ослизненной и расплзается на волокна; конус оседает на дно колбы. По указанным изменениям судят о процессе разложения клетчатки.

Для микроскопического изучения берут бактериологической петлей или препаровальной иглой немного слизи, покрывающей бумагу, или кусочек разложившейся фильтровальной бумаги. Растирают ее на предметном стекле в капле питательной смеси, взятой из кол-

бы, готовят мазок, окрашивают фуксином и исследуют под микроскопом. При микроскопии могут быть обнаружены грибы и их споры, бактерии — длинные, слегка изогнутые с заостренными концами палочки — *Cytophaga*; короткая изогнутая палочка — целлюлозный вибрион — *Cellvibrio*; короткая толстая палочка с заостренными концами — *Cellfalcicula*.

Хорошие результаты дает метод почвенных пластинок Кристенсена. Почву, увлажненную до полной влагоемкости, насыпают в чашки Петри и слегка утрамбо-

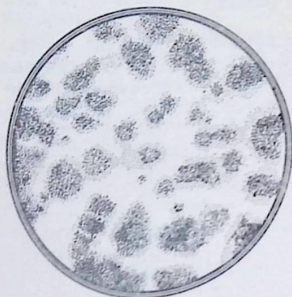


Рис. 74. Зоны разложения фильтровальной бумаги

вывают шпателем. На поверхность почвы кладут кружок стерильной фильтровальной бумаги или обеззоленного фильтра. Фильтр приглаживают шпателем к почве. Чашки выдерживают во влажной камере при 25—27° С. Через 4—5 сут на бумаге появляются пигментные зоны и ослизненные участки, указывающие на разрушение клетчатки (рис. 74).

Для изучения возбудителей берут кусочки разлагающейся

фильтровальной бумаги, переносят его на предметное стекло в каплю физиологического раствора или воды и разрывают иглами на отдельные волокна. Препарат покрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом ($\times 40$). Для изучения убитых бактерий готовят мазок, окрашивают его фуксином и рассматривают под иммерсией.

Глава VI

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Азот — важнейший органогенный элемент, входящий в состав белковых веществ любого живого существа. Источником азота для всех форм жизни является минеральный азот. Однако животные для синтеза специфических белковых веществ используют содержащие азот комплексные соединения, входящие в состав растений. С точки зрения «азотного питания» животный мир находится в полной зависимости от растительного мира.

Растения синтезируют протенновые вещества только из запасов минеральных и азотистых веществ почвы. Связанный азот органических соединений так же, как и молекулярный азот атмосферы, большинством зеленых растений не усваивается. Для их развития необходимы минеральные формы азота в виде нитратов.

В то же время известно, что резервы минеральных форм азотистых соединений в почве незначительны. Их количество составляет в среднем 50 мг азота на 1 кг пахотной земли. Если бы почва не пополнялась минеральными формами азота, то его запасы быстро были бы использованы растительностью, почвы истощились бы и потеряли свое плодородие.

Возвращение усвояемых растениями форм азота в почву осуществляется различными путями: частично азот попадает в почву в форме нитратов из атмосферы, где они образуются в результате грозových разрядов, частью его запасы пополняются за счет вулканических извержений. Однако эти пополнения слишком незначительны и не могут обеспечить тех колоссальных потребностей, которые необходимы. Пополнение основных запасов усвояемых форм азотистых соединений происходит в результате минерализации органических азотсодержащих веществ под влиянием микроорганизмов. Процесс минерализации органических азотсодержащих веществ проходит через сложный цикл последователь-

ных превращений, включая процессы аммонификации белковых веществ, нитрификации, денитрификации и фиксации молекулярного азота. Во всех этих процессах деятельное участие принимают различные физиологические группы микроорганизмов.

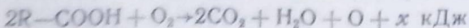
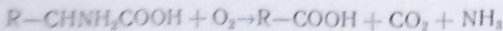
Аммонификация белковых веществ

Разложение белков микроорганизмами связано с использованием этих веществ в качестве источников азотистого и углеродного питания, расходуемого на покрытие энергетических затрат и построение тела микробов.

Аммонификация — сложный и многообразный процесс распада белка, сопровождающийся образованием свободного аммиака. Процесс распада белков начинается с их гидролиза под влиянием протеолитических ферментов, выделяемых микробами. Гидролиз идет постепенно с образованием ряда промежуточных продуктов. Первичными продуктами гидролиза являются пептоны и полипептиды. Они образуются в результате расщепления белковой молекулы ферментом протеиназой. Пептоны и полипептиды под влиянием полипептидазы расщепляются до дипептидов, которые расщепляются дипептидазой до аминокислот.

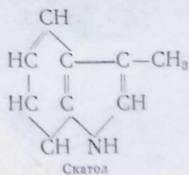
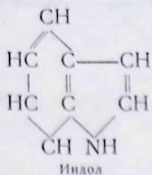
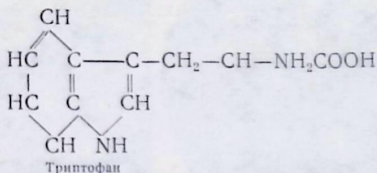
Образовавшиеся при распаде белка аминокислоты подвергаются дальнейшему расщеплению под действием различных ферментов (дезаминаз, амидаз, дегидраз, декарбоксилаз). Этот процесс начинается с дезаминирования аминокислот, в результате которого образуются аммиак и разнообразные органические соединения в соответствии с характером самих аминокислот и окружающих условий. Так, при разложении аминокислот жирного ряда образуются муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная и другие кислоты; пропиловый, бутиловый, амиловый и подобные им спирты.

В аэробных условиях эти продукты промежуточного распада аминокислот подвергаются окислению и могут быть полностью минерализованы до конечных продуктов — аммиака, углекислого газа, воды, сероводорода и солей фосфорной кислоты:



Образующийся при аммонификации аммиак в водном растворе дает сильное основание NH_4OH , которое обуславливает некоторое подщелачивание почвы. Это способствует активации протеаз и ускорению распада белка до аминокислот.

В анаэробных условиях продукты промежуточного распада аминокислот полностью не окисляются. В связи с этим помимо NH_3 и CO_2 , накапливаются различные органические кислоты, спирты, амины и другие органические соединения, обладающие ядовитыми свойствами и неприятным запахом. Так, при разложении серосодержащих аминокислот выделяются сероводород (H_2S) и его производные (меркаптаны). При распаде аминокислот ароматического ряда, например триптофана, в качестве продуктов дезаминирования и декарбоксилирования образуются индол и скатол, обладающие неприятным запахом:



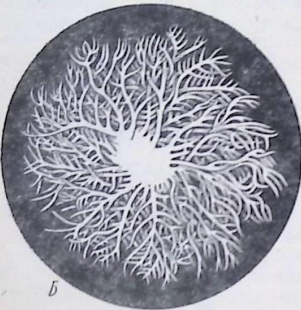
Образующиеся при этом органические кислоты разлагаются очень медленно и накапливаются в почве. Среда подкисляется и, как следствие этого, ферментативный распад белков до аминокислот резко замедляется.

Скорость минерализации белка и накопление аммиака зависят от соотношений углерода и азота в почве (C:N), температуры, влажности, pH, аэрации и др.

Рис. 75. *Bac. mycoides*:
А — вегетативные клетки;
Б — колония на агаре



А



Б

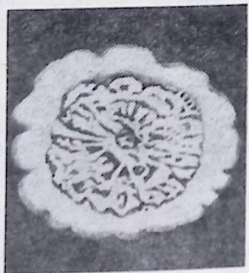


Рис. 76. Колония *Bac. mesentericus*

Возбудители процесса аммонификации. Наиболее активными участниками разложения белка являются следующие микроорганизмы.

Аэробные бактерии. *Bac. mycoides* — небольшая палочка длиной 1,6—3,6 мкм, дающая споры овальной формы различной величины, подвижная; жгутики расположены вокруг всего тела. Развиваясь на плотных питательных средах, образует характерные стелющиеся по поверхности колонии с отходящими пучками изгибающихся нитей, напоминающие колонии плесеней (отсюда и название *mycoides* — грибовидный). Это одна из наиболее распространенных аэробных почвенных бактерий (рис. 75).

Bac. mesentericus — небольшая (1,5—5 мкм), подвижная, перетрихально жгутиковая, спорообразующая палочка, часто соединенная в цепочки. Аэроб, оптимум развития 35—45° С. На картофельных питательных средах образует тонкие, сухие колонии с морщинистой поверхностью, похожие на брыжейку (отсюда видовое название *mesentericus*, рис. 76).

Bac. subtilis (сенная палочка) — короткая, подвижная, спорообразующая палочка с закругленными концами, величиной $3\text{--}5 \times 0,6$ мкм. Овальная спора расположена в центре бактерий. На питательных средах образует плотные, мелкие, морщинистые колонии, срастающиеся с агаром (рис. 77). Температурный оптимум лежит в пределах 37—50°, а температурный максимум роста 60° С.

Кроме указанных бактерий имеют значение некоторые пигментообразующие бактерии (*Pseudomonas fluorescens*, *Bac. putidum*, *Chromobacter prodigiosum*), а также бактерии, разлагающие мочевины (*Micrococcus ureae*, *Sarcina ureae*, *Urobacillus pasteurii*) и хитин (*Bac. chitinovororum*), актиномицеты и грибы.

Факультативные анаэробы. *Proteus vulgaris* (протей) — мелкие (1,6—4 мкм), бесспорные,

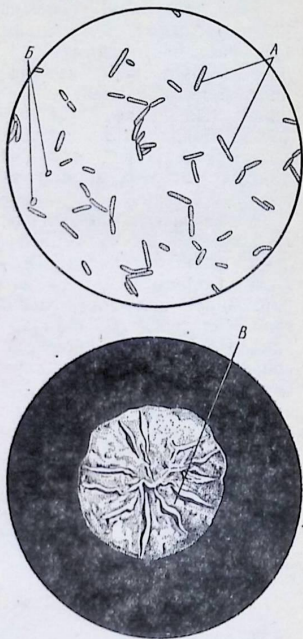


Рис. 77. *Bac. subtilis*: А — вегетативные клетки; Б — споры; В — колония на агаре

подвижные палочки, сильно меняющие свою форму и размеры при развитии на питательных средах различного состава. При разложении белка создают слабощелочную реакцию и образуют сероводород и индол. Колонии на МПА имеют вид нежного стелющегося налета.

Escherichia coli (кишечная палочка) — короткая (2—4×0,5 мкм), подвижная, бесспорная палочка с закругленными концами. По Граму окрашивается отрицательно. При росте на мясо-пептонном бульоне вызывает общее помутнение, на агаре дает серовато-белый налет. На дифференциально-диагностических средах (Эндо, Левина, Плоскирева) образует окрашенные колонии вследствие разложения лактозы. Сбраживает лактозу, глюкозу, маннит и мальтозу с образованием кислоты и газа.

Анаэробные бактерии. *Clostridium putrificum* (гнилостная палочка) — небольшая, подвижная, спорообразующая палочка (5,6×0,8 мкм). Споры располагаются на одном из ее концов, вызывая утолщение в виде барабанной палочки. Углеводы не сбраживают. Разлагают белки в строго анаэробных условиях с образованием большого количества газов. Встречается в гниющих трупах, пищевых продуктах, навозе, почве, консервах.

Cl. sporogenes (спорогенная палочка) — подвижная, спорообразующая палочка размером 5—6 мкм. При разложении белка образует большое количество H₂S. Оптимум роста 37° С.

В разложении белковых веществ деятельное участие принимают актиномицеты, плесневые грибы, например, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* и др., а также простейшие.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Стерильный МПБ в пробирках, МПЖ в чашках, полоски красной лакмусовой бумаги, полоски фильтровальной бумаги (0,5×5 см), пропитанные раствором уксуснокислого свинца (для определения H₂S) и шавелевой кислоты (для определения индола), почва, пинцет, микроскоп, краски, стекла, пробирки с физиологическим раствором.

Задание. 1. Изучить морфологию возбудителей маслянокислого и пектинового брожения.

2. Поставить накопительную культуру аммонифицирующих бактерий.

Методические указания. Для выделения и количественного определения аммонифицирующих бактерий пользуются средами, содержащими натуральные белки или продукты их распада. Чаще всего из жидких сред пользуются мясо-пептонным бульоном, а из плотных — МПБ и МПЖ.

Для определения численности бактерий, разлагающих белковые вещества, готовят разведения почвы от 1:100 до 1:10 000 000. Стерильной градуированной пипеткой вносят в стерильную чашку Петри по 1 мл исследуемого материала и заливают охлажденным до 45° С агаром. Из каждого разведения делают посевы параллельно в три чашки. Засеянные чашки выдерживают в термостате при температуре 22—25° С. Учет колоний производят на 3—5-е сутки и только в тех чашках, где выросло не более 100 и не менее 10 колоний.

Для определения количества бактерий, обладающих протеолитическими ферментами, делают посевы почвенной болтушки на мясо-пептонную желатину. Счет колоний проводят через 48 ч. Подсчитывают колонии, вокруг которых есть зоны разжижения желатины.

При вычислении содержания в почве бактерий, минерализирующих белки и обладающих протеолитическими ферментами, высчитывают среднее число из количества выросших колоний на всех параллельных чашках. Результаты выражают на 1 г почвы.

Для определения количества спорообразующих бактерий в почве исследуемые образцы сначала подсушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния. При этом вегетативные клетки переходят в стадию спор. Затем из почвы готовят суспензию (1:10 или 1:100) и разливают по 3—5 мл в стерильные пробирки. Пробирки выдерживают в водяной бане при температуре 80° С в течение 10 мин.

Пастеризованную суспензию высевают. Для этого градуированной пипеткой наносят на поверхность подсушенного агара 0,05 мл суспензии. Каплю втирают в агар стеклянным шпателем. Лучшей питательной средой для выращивания спорообразующих видов считается смесь мясо-пептонного агара и сусло-агара (1:1), рН 7,0—7,2. Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре 25—30° С в течение 48—72 ч. Подсчитывают количество выросших колоний и оставляют чашки при комнатной температуре на 4—5 сут.

За это время колонии подрастут и приобретут характерную для вида морфологию.

Для учета анаэробных микроорганизмов чашки с посевами помещают в анаэробные условия.

Для определения аммонифицирующих бактерий, разлагающих белковые вещества с образованием аммиака, сероводорода и индола, производят посев почвенной суспензии в мясо-пептонный бульон или в пептоновую воду.

Бактериологической петлей берут над пламенем горелки каплю почвенной суспензии и переносят в пробирку с МПБ. В пробирку вставляют индикаторные бумажки: для обнаружения аммиака — красный лакмус, для определения сероводорода — бумажку, пропитанную уксуснокислым свинцом, а для индола — со шавелевой кислотой. Бумажки прижимают к пробирке ватной пробкой; они должны свободно свешиваться в пробирке, не касаясь ее стенок и среды. Пробирки плотно закрывают сверху пергаментом, целлофаном или резиновым колпачком (соской) и помещают в термостат с температурой 25—30° С. Наблюдение за изменением среды ведется через 1; 3; 5 и 7 дн. после посева.

При наличии в исследуемой почве аммонифицирующих микроорганизмов среда в течение первых же суток мутнеет и из пробирки выделяются неприятно пахнущие газы. При разложении белковых веществ с образованием аммиака вложенная в пробирку красная лакмусовая бумажка синее.

Качественную реакцию на аммиак можно провести также с помощью фильтровальных бумажек, пропитанных реактивом Крупа. Реактив Крупа представляет собой смесь, состоящую из одной части 3%-ной серной кислоты и двух частей 1%-ного водного раствора фуксина, приготовленного из насыщенного спиртового раствора. Этой смесью после ее побурения пропитывают полоски фильтровальной бумаги. После высушивания бумага должна быть белой или слегка желтоватой. В присутствии же аммиака бумажки приобретают ярко-красный цвет.

Выделяемый при разложении серусодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин) сероводород определяют по потемнению полоски фильтровальной бумажки, пропитанной основным раствором уксуснокислого свинца. Последний, связываясь с сероводоро-

дом, переходит в сернистый свинец, имеющий черный цвет.

Образование индола бактериями связано с наличием у них фермента триптофаназы, расщепляющей гетероциклическую аминокислоту — триптофан.

Индолообразование определяется по покраснению полоски фильтровальной бумажки, находящейся в пробирке, пропитанной горячим насыщенным раствором щавелевой кислоты (способ Морелли).

Нитрификация

Нитрификацией называется процесс окисления аммиака в азотную кислоту через промежуточную стадию азотистой кислоты.

Процесс нитрификации аммиака происходит в две фазы при участии двух специализированных групп аэробных бактерий.

В первую фазу аммиак окисляется до солей азотистой кислоты:

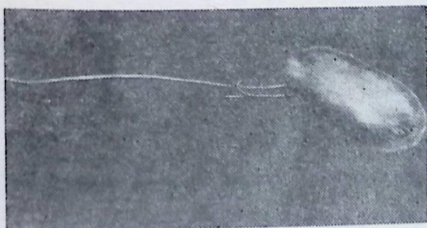
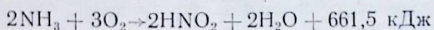


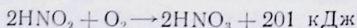
Рис. 78. Электронная микрофотография *Nitrosomonas europaea*

В этом процессе участвуют нитрозные бактерии, относящиеся к трем родам: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis* и *Nitrospira*. *Nitrosomonas* — овоидный кокк с одним длинным жгутиком, спор не образует (рис. 78). Имеется пять разновидностей этого микроорганизма, различающихся по форме и отношению к pH, который колеблется у отдельных типов от 7,4 до 9,5.

Nitrosocystis — кокки величиной около 1,5 мкм, способны образовывать зооглен — скопления кокков, окруженные общей слизистой капсулой.

Nitrosospira включает два вида: *Nitrosospira bria* и *Nitr. arctica*. Оба вида имеют правильную спиральную форму, длина клетки достигает 20 мкм, хотя встречаются и очень мелкие, кокковидные организмы. Развиваются преимущественно в необработанных целинных почвах.

Во вторую фазу нитрификации соли азотистой кислоты окисляются в соли азотной кислоты:



В этом процессе участвуют нитратные бактерии, относящиеся к роду *Nitrobacter*. Это мелкие, округлые, яйцевидные или грушевидные клетки размером до 1,5 мкм. Встречаются короткие, неподвижные, бесспорные палочки с заостренными концами размером $1,2 \times 0,8$ мкм. Палочки иногда соединяются в цепочки, по Граму красятся отрицательно. На 5—6-е сутки в культурах появляются овальные или грушевидные подвижные клетки (рис. 79).

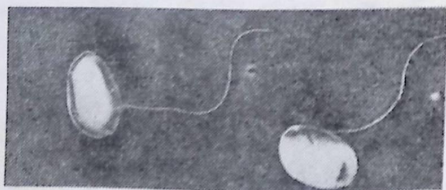


Рис. 79. Электронная микрофотография *Nitrobacter*

Nitrobacter подразделяют на два вида: *Nitrobacter winogradsky* и *Nitr. agilis*.

Нитрифицирующие бактерии строго специфичны в отношении окисляемого вещества: нитрозные бактерии не действуют на нитраты, а нитратные — не окисляют аммонийных солей. Это типичные хемосинтезирующие автотрофы. Они ассимилируют углекислоту из воздуха в отсутствие света. Энергию для этого процесса они получают при окислении аммиака и азотистых сое-

динений. Они синтезируют все органические вещества клеток (аминокислоты, витамины, полисахариды) из неорганических элементов и углекислого газа.

Благодаря деятельности нитрифицирующих бактерий огромные массы газообразного аммиака, образуемого в процессе аммонификации, фиксируются в почве и переводятся в нитраты, являющиеся лучшим источником азотного питания для растений. В результате своей физиологической деятельности они создают плодородные почвы, превращая малодоступные и недоступные растениям аммиачные соли и аммиак в легкоусвояемые растениями минеральные формы азотистой пищи. Поэтому процесс нитрификации должен рассматриваться как один из важнейших биологических процессов почвы. При благоприятных условиях в течение года в пахотном слое 1 га почвы может накапливаться до 300 кг азотной кислоты.

Такое количество нитратов создает не только хорошие условия для азотного питания растений, но и оказывает большое влияние на перевод фосфорнокислых солей в доступную для растений форму.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Накопительные культуры брожения пектиновых веществ анаэробного и аэробного разложения клетчатки, почва, колбочки с жидкой средой С. Н. Виноградского, пастеровские пипетки, фарфоровые чашечки, реактивы: цинк-иод-крахмал, дифениламин, крепкая серная кислота, 20%-ный раствор серной кислоты, пирогаллол.

Задание. 1. Изучить химизм процесса и морфологию возбудителей брожения пектиновых веществ.

2. Изучить морфологию возбудителей анаэробного и аэробного разложения клетчатки.

3. Поставить накопительную культуру нитрифицирующих бактерий.

Методические указания. Для накопления нитрозных бактерий применяют жидкие и плотные элективные питательные среды, содержащие азот в форме аммонийных соединений и минеральные вещества. Для нейтрализации образующейся азотистой кислоты в среду вносят карбонаты кальция и магния. В такой среде создаются очень благоприятные условия для развития нитрозных бактерий. Сопутствующие сапрофитные мик-

роорганизмы не находят в ней условий для своего развития, так как нет органических веществ. Этим требованиям наилучшим образом соответствует жидкая среда С. Н. Виноградского, имеющая следующий состав:

Вода водопроводная	1000 мл
Аммоний сернокислый	2,0 г
Калий кислый фосфорнокислый	1,0 г
Магний сернокислый	0,5 г
Натрий хлористый	2,0 г
Железо сернокислое	0,4 г
Кальций (или магний) сернокислый	1,0 г

Среду наливают в конические колбочки емкостью 150—200 мл тонким слоем (0,5—1,0 см) и стерилизуют в автоклаве 30 мин при 1 атм. При разливке среду необходимо хорошо встряхнуть, так как в ней образуется осадок фосфорнокислого железа.

В питательную среду вносят землю (около 0,5 г на колбу) и помещают в термостат с температурой 25—30° С. Через 12—14 дн. на поверхности жидкости образуется легкая пленка, состоящая из нитрозных бактерий, а в среде исчезает аммиак и появляется сначала азотистая, а затем азотная кислота.

Для обнаружения в питательной среде продуктов жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий проводят качественные реакции с цинк-йод-крахмалом или дифениламиноом.

Цинк-йод-крахмальный раствор готовят следующим образом: 4 г крахмала растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды; в 100 мл дистиллированной воды растворяют 20 г хлористого цинка при подогревании; к кипящему раствору хлористого цинка приливают суспензию крахмала и смесь кипятят до прояснения, доливая в нее дистиллированную воду до первоначального объема; к прозрачной смеси прибавляют 2 г сухого иодистого цинка, доливают дистиллированной водой до 1 л и фильтруют. Реактив хранят в темной посуде с притертой пробкой.

Определение нитритов. В фарфоровую чашечку или на часовое стекло капают 1 каплю 20%-ного раствора серной кислоты и добавляют к ней три капли реактива цинк-йод-крахмал. К смеси добавляют 1 каплю исследу-

емой питательной среды. В присутствии NO_2 смесь окрашивается в синий цвет. Это происходит вследствие вытеснения азотистой кислотой свободного йода из йодисто-водородной соли. Свободный йод вступает во взаимодействие с крахмалом, обуславливая синюю окраску.

Реакция с дифениламином. К 2 каплям крепкой серной кислоты в фарфоровой чашечке прибавляют кристаллик дифениламина. После растворения последнего к смеси добавляют 1 каплю исследуемой среды. Если в среде имеется NO_2^- или NO_3^- , то смесь окрашивается в темно-синий цвет. Чувствительность реакции очень высокая (1:100 000).

Для определения нитратов в среде необходимо разрушить содержащиеся в ней нитриты. Для этого среду кипятят с NH_4Cl в присутствии 30%-ной уксусной кислоты. После кипячения проводят реакцию с дифениламином. Появление синего окрашивания свидетельствует о наличии в среде нитратов, накопившихся в результате второй фазы нитрификации.

Реакция с пирогаллолом. К 10 мл культуры добавляют 0,2 г пирогаллола и хорошо перемешивают. Опустив кончик пипетки в жидкость, к смеси осторожно приливают 2 мл крепкой серной кислоты. В пробирку бросают кристаллик (0,1 г) NaCl . На границе смесь — кислота наступает вскипание жидкостей и появляется кольцо пурпурного цвета. Интенсивность окраски и ширина кольца указывают на количественное содержание нитратов.

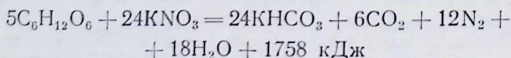
Изучение морфологии бактерий проводится в мазках, приготовленных из питательной среды, окрашенных фуксином.

В поле зрения микроскопа будут видны или овальные клетки нитрозных бактерий (I фаза), или мелкие палочки нитратных бактерий (II фаза).

Денитрификация

Денитрификацией называют процесс восстановления нитратов через стадию нитритов до аммиака и свободного молекулярного азота. Различают прямую и косвенную денитрификацию. При прямой денитрификации восстановление нитратов осуществляется в результате жизнедеятельности особой группы так называемых

денитрифицирующих бактерий. Процесс прямого восстановления нитратов денитрифицирующими бактериями имеет для них энергетическое значение — за счет восстановления нитратов они окисляют органические вещества:



В качестве промежуточных продуктов восстановления сначала получают азотистая (HNO_2) и азотноватистая (HNO) кислоты, которые превращаются в гипонитрит и далее — в гидроксилламин и NH_3 , а затем в N_2 и N_2O .

В аэробных условиях денитрифицирующие бактерии обычно не восстанавливают нитраты, а используют в процессе дыхания свободный кислород воздуха. Таким образом, нитраты в анаэробных условиях являются акцепторами водорода вместо кислорода воздуха, представляющего собой акцептор водорода в аэробных условиях.

Наиболее активны следующие возбудители прямой денитрификации.

Pseudomonas denitrificans — маленькие, перетрихально жгутиковые, беспоровые палочки; факультативный анаэроб. Восстанавливают нитриты до молекулярного азота.

Pseudomonas fluorescens — небольшие, беспоровые, грамотрицательные, подвижные палочки, образующие зеленоватый пигмент и окрашивающие среду в желто-зеленый цвет. Очень активно восстанавливают нитраты с образованием молекулярного азота.

Achromobacter stutzeri — небольшие, грамотрицательные палочки ($0,3 \times 0,5$ мкм), соединенные в цепочки. Восстанавливают нитраты в анаэробных условиях.

Pseudomonas putrescens — небольшие, беспоровые, грамотрицательные, подвижные палочки; лучше развивается в аэробных условиях, образует пигмент, окрашивающий среду в сине-зеленый цвет. Восстанавливают нитраты до нитритов и даже до молекулярного азота.

Все бактерии широко распространены в почве и воде и активно восстанавливают нитриты при плохой аэрации и высокой влажности почвы.

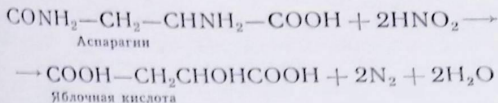
Процесс прямой, или «истинной», денитрификации нежелателен, так как в результате его легкодоступные

и хорошо усваиваемые растениями азотистые соединения теряют азот. Минеральный азот переходит в газообразную форму и не может усваиваться растениями. Установлено, что в процессе денитрификации потери азота могут достигать 20% от общего количества нитратов в почве. Однако ошибочно думать, что процесс денитрификации является широко распространенным. Основные условия, способствующие денитрификации, — высокая влажность почвы, плохая аэрация ее, избыток легкоокисляемых безазотистых органических соединений и нитритов, плохой дренаж, определенная кислотность (рН 7,0—8,2) и температура.

При отсутствии этих условий, даже при наличии большого количества денитрифицирующих бактерий в почве, заметного уменьшения азота в результате денитрификации не наблюдается. Большое количество денитрифицирующих бактерий в плодородных почвах, в ризосфере и на корнях хорошо развитых растений при определенных условиях может играть положительную роль. Многие денитрифицирующие бактерии, обладая широким набором ферментов, могут вызывать сопряженное течение процессов аммонификации и денитрификации. Денитрифицирующие бактерии способны не только восстанавливать нитраты. Роль их в биологическом круговороте веществ в природе очень разнообразна.

Косвенная денитрификация происходит в результате чисто химического взаимодействия между аминокислотами, аминными и амидными соединениями и азотистой кислотой.

В результате этого взаимодействия также получается молекулярный азот:



Роль микроорганизмов в этом процессе сводится к образованию нитритов и аминокислот. Поэтому косвенной денитрификации способствуют многие виды самых различных бактерий, восстанавливающих нитраты до нитритов или разлагающих белковые вещества с образованием аминокислот и их амидов.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Питательная среда в круглых колбах с узким горлом, почва, шпатель для внесения почвы, дифениламин, крепкая серная кислота, пипетки, фарфоровая чашечка.

Задание. 1. Поставить накопительную культуру денитрифицирующих бактерий.

2. Изучить химизм процесса и морфологию возбудителей.

Методические указания. Для получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий готовят минеральную питательную среду, содержащую в качестве источника азота соли азотной кислоты. Хороший рост денитрифицирующих бактерий можно получить на среде следующего состава при pH 7,0:

Вода водопроводная	100 мл
Сахароза	2,0 г
Натрий азотнокислый	0,2 г
Калий кислый фосфорнокислый	0,2 г

Среду разливают по колбам и стерилизуют в автоклаве 30 мин при 1 атм.

Для заражения денитрифицирующими бактериями в среду вносят небольшое количество (0,5 г) почвы, взятой с необрабатываемого сильно увлажненного земельного участка. Колбу закрывают резиновой пробкой и помещают в термостат с температурой 35°С на 2—3 недели.

О готовности накопительной культуры можно судить по выделению пузырьков газа со дна колбы и по редукции нитратов в питательной среде, появлению нитритов и аммиака.

Восстановление солей азотной кислоты определяют реакцией с дифениламином в крепкой серной кислоте. Отсутствие голубого окрашивания смеси среды с дифениламином указывает на восстановление нитратов до молекулярных форм азота. Отсутствие солей азотистой кислоты определяют реакцией с цинк-иод-крахмалом.

Для изучения морфологии денитрифицирующих бактерий готовят мазок из осадка, окрашивают фуксином и исследуют иммерсионным объективом. В поле зрения микроскопа видны небольшие бесспоровые палочки денитрифицирующих бактерий.

Глава VII

ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА, СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ, ФОСФОРА

Общее содержание азота в почвах достигает 15 т на 1 га. Основная масса его содержится в гумусе почв в органической форме, недоступной для растений. Воднорастворимых, доступных для питания растений соединений азота содержится в почвах около 1%.

Ежегодно с урожаем сельскохозяйственных культур во всем мире из почвы уносится 100—110 млн. т азота. Возвращается в почву с азотными удобрениями около 15% потребленного растениями азота. При таком соотношении потребленного и возвращенного азота запас азотистых соединений почвы мог бы исчерпаться за 50—75 лет, однако этого не происходит. Объясняется это тем, что дефицит его в почве в значительной мере восполняется за счет азота, связываемого биологическим путем из атмосферы. Биологическая фиксация азота осуществляется свободноживущими в почве микроорганизмами и бактериями, сосуществующими в симбиозе с бобовыми и небобовыми растениями.

В почвах, в пресных водоемах, в морях и океанах обитает более 80 видов и разновидностей бактерий, несколько видов спирохет, актиномицетов, дрожжей и дрожжеподобных организмов, плесневых грибов, микоризных бактерий и водорослей, способных фиксировать молекулярный азот. За один год в пахотном слое почвы на площади 1 га свободноживущие бактерии накапливают 10—15 кг азота, а симбиотическая ассоциация бактерий с бобовыми растениями — до 150—200 кг. Усвоенный молекулярный азот откладывается в клетках микроорганизмов в виде белковых соединений, а часть его может выделяться в растворимой форме в почву и усваиваться растениями. При распаде отмерших мик-

робных клеток он освобождается в химически связанной форме и, минерализуясь, становится доступным для питания высших растений.

Биохимизм процесса азотфиксации до настоящего времени полностью не раскрыт. Считают, что присоединение молекулярного азота к протоплазме микробных клеток происходит в результате окислительно-восстановительных реакций, катализируемых азотфиксирующими ферментными системами. Эти системы имеют индуктивный характер. Они синтезируются азотфиксирующими микроорганизмами после истощения из окружающей питательной среды доступных соединений азота. Азотфиксирующие ферментные системы представляют собой, по-видимому, усложненную форму ферродоксинов, состоящую из нескольких компонентов, содержащих в своем составе молибден, железо и магний.

В симбиотических азотфиксирующих системах фиксация осуществляется в теле микробных клеток (в бактероидах), синтезирующих азотфиксирующие ферменты. На каких-то этапах этого процесса принимает участие «леггемоглобин» (гемоглобин бобовых) содержащийся в клубеньках, активно фиксирующих азот.

По данным С. Н. Виноградского, С. П. Костычева и А. Н. Баха, первым продуктом связывания молекулярного азота является аммиак. Исследования последних лет полностью подтвердили сформулированную А. Н. Бахом теорию ферментативного механизма азотфиксации, рассматривающую этот процесс как сопряженное действие биологических окислительно-восстановительных катализаторов, завершающееся образованием аммиака. Аммиак является непосредственным материалом для синтеза белков.

Наибольшее значение для сельскохозяйственного производства имеют свободноживущие в почве азотфиксирующие микроорганизмы и бактерии, фиксирующие азот в симбиозе с бобовыми растениями, — клубеньковые бактерии.

Свободноживущие в почве азотфиксаторы

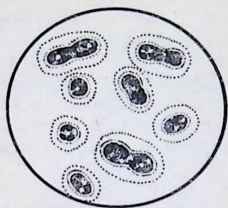
К свободноживущим в почве микроорганизмам, способным фиксировать молекулярный азот атмосферы, относят *Clostridium*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, некоторые

спириллы, серобактерии, дрожжи и синезеленые водоросли.

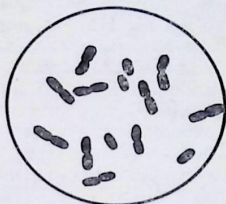
Clostridium pasteurianum — типичный представитель анаэробного процесса фиксации азота. В молодых культурах этот микроб имеет вид прямых палочек с закругленными концами размером $2,5—7,5 \times 0,5$ мкм. Палочки располагаются одиночно или парами и имеют множество жгутиков, разбросанных по всей поверхности клетки. При старении клетки приобретают характерную веретенообразную форму с округлой спорой, расположенной ближе к одному из концов (см. рис. 69). В протоплазме клеток накапливается большое количество крахмалоподобного вещества — гранулы, дающей с иодом голубое окрашивание. Споры не окрашиваются.

Оптimum pH 5,6—7,4. Сбраживает сахара с образованием масляной и уксусной кислот, CO_2 и H_2 , связывает 10—12, а иногда 27 мг азота на 1 г сброженного сахара.

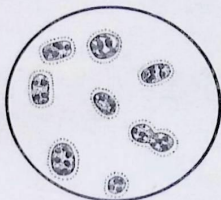
Azotobacter chroococcum — наиболее распространенный вид. Это подвижные клетки размером $2—7 \times 1,5—2,5$ мкм, в молодых культурах палочковидные, с возрастом приобретающие шаровидную форму.



А



Б



В



Г

Рис. 80. Виды азотобактера:
А — *Azotobacter chroococcum* Beijerinck;
Б — *Azotobacter agile* Beijerinck;
В — *Azotobacter vinelandii* Zipman;
Г — *Azotobacter beijerinckii*

Клетки соединены парами или более крупными группами и окружены большой слизистой капсулой (рис. 80). Они образуют темно-коричневый пигмент, нерастворимый в воде. Характерной особенностью вида является способность использовать крахмал в качестве единственного источника углерода. При росте на средах с достаточным количеством питательных веществ внутри клеток накапливается большое количество зерен запасного питательного материала. Зерна сильно преломляют свет, благодаря чему при рассмотрении под микроскопом неокрашенных препаратов они имеют зеленоватый оттенок. Это один из наиболее активных фиксаторов азота. На 1 г сброженного сахара он усваивает до 20 мг атмосферного азота.

Azotobacter agile — крупные, шаровидные или слегка овальные ($2,5 \times 5,5$ мкм), очень подвижные клетки, соединенные чаще всего парами. Клетки имеют гомогенную протоплазму с крупными зернами запасного питательного вещества. Вокруг клеток имеется тонкий ободок слизистой капсулы; выделяет в среду желтый или зеленоватый пигмент. Усваивает до 10—15 мг азота на 1 г энергетического материала. Чаще всего встречается в пресных водоемах.

Azotobacter vinelandii — в молодом возрасте мелкие ($0,8 \times 2,5$ мкм), подвижные, перетрихально жгутиковые палочки. С возрастом клетки укорачиваются и приобретают шаровидную форму. При росте на средах образует сине-зеленый пигмент, связывает около 15 мг азота на 1 г сахара.

Azotobacter indicum — имеет мелкие палочковидные клетки размером $1,5-3 \times 0,5-1,5$ мкм с крупными зёрнышками жира и большими слизистыми капсулами. Образует ржаво-красные и коричнево-красные пигменты. Не растет на средах с натуральным белком, однако добавление к питательной среде небольших количеств азотсодержащих веществ (солей аммония, пептона, гидролизата казеина) стимулирует рост этого микроорганизма.

Все перечисленные и другие виды азотобактера относятся к аэробным микроорганизмам и лучше всего развиваются при свободном доступе воздуха. Оптимум pH лежит в пределах 7,2—8,0.

Azotobacter beijerinckii — слегка овальные, крупные ($3,5-6,5 \times 2-2,5$ мкм), с закругленными концами клет-

ки, соединенные попарно в тетрады и короткие цепочки. Клетки неподвижны, окружены слизистой капсулой. Образуют светло-коричневый или желтый пигмент, неразрывимый в воде. Оптимум pH 4,5—5,5.

Бактерии из рода *Beijerinckia* распространены главным образом в почвах тропических стран (Индия, Индонезия, Южная Америка, Австралия, Африка, в нашей стране — в Грузии) и почти не встречаются в почвах умеренной зоны. Представители этого рода живут и проявляют свою деятельность на поверхности листьев тропических растений. Бактерии имеют палочковидную форму размером $2-3 \times 0,5$ мкм. В молодых культурах подвижны; с возрастом подвижность утрачивается.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Питательная среда в колбах, почва, шпатель для почвы, микроскоп, стекла, краски.

Задание. 1. Изучить химизм процессов, определить продукты жизнедеятельности и морфологию возбудителей аммонификации белковых веществ, нитрификации и денитрификации.

2. Поставить накопительную культуру свободноживущих в почве азотфиксаторов.

Методические указания. Для изучения свободноживущих в почве азотфиксаторов готовят накопительную культуру. Лучшей средой для развития этих бактерий считается минеральная среда Эшби, не содержащая солей азота. Состав питательной среды следующий:

Манинит (или глюкоза)	20,0 г
Калий фосфорный двухосновный	0,2 г
Магний сернистый	0,2 г
Натрий хлористый	0,2 г
Калий сернистый	0,1 г
Железо сернистое	следы
Мел	5,0 г
Вода водопроводная	1000 мл

Приготовленную питательную среду разливают по колбам емкостью 100—150 мл слоем 1—1,5 см и стерилизуют. Вносят в среду небольшое количество почвы

(0,5 г) или почвенной «болтушки». Колбу помещают в термостат с температурой 22—25° С на 10—14 дн. Азотобактер лучше развивается в жидкой среде, в которую помещен сложенный конусом фильтр (рис. 81).

При наличии в почве свободноживущих азотфиксаторов на 5—6-й день на поверхности питательной среды, на фильтре и на стенках колбы появляется быстро буреющая пленка содержащая *Azotobacter chroococcum*,

а на дне жидкости, которая к этому времени слегка мутнеет, пенится и издает запах масляной кислоты, скапливается *Clostridium pasteurianum*.

Для микроскопического исследования готовят мазки из побуревшей пленки и со дна колбы.

В первом препарате находят крупные, круглые или овальные клетки азотобактера, покрытые толстой слизистой капсулой (зооглея). Во втором препарате находят веретенообразные, с продолговатой спорой в центре клетки

Cl. pasteurianum.

Определение количества фиксированного бактериями азота может быть произведено химическим путем одной из модификаций микрометода Кьельдаля. Для определения количества фиксированного азота лучше пользоваться жидкими питательными средами с глюкозой. Это позволяет более точно рассчитать результаты на 2 г использованного сахара и избежать трудностей, связанных с определением количества маннита, содержащегося в среде.

Симбиотические азотфиксаторы

В процессе эволюции некоторые микроорганизмы приобрели способность к жизни и размножению не только на поверхности корней, но и в глубине их тка-

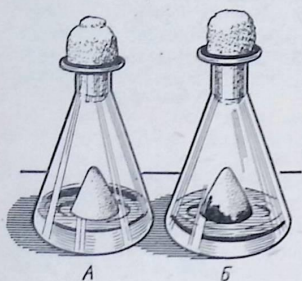


Рис. 81. Культивирование азотобактера в колбах с фильтрами: А — начало опыта; Б — в конце опыта

ней. К таким бактериям относятся так называемые клубеньковые бактерии, включающие виды из рода *Бактерия* *biut*. Клубеньковые бактерии могут существовать длительное время в почве как обычные сапрофиты, подобно корневым и ризосферным бактериям. Они размножаются в почве, удовлетворяя свои потребности в питательных веществах за счет усвоения азота из корневого экзосмоса различных, в том числе и бобовых, растений. Клубеньковые бактерии проникают в корни растений из почвы через корневые волоски в месте проникновения бактерий происходит деление клеток корня, благодаря чему формируются клубеньки. Форма и размер клубеньков, а также их положение на корнях зависит как от активности бактерий, так и от растений, на которых они поселяются. Так у гороха, клевера и вики клубеньки образуются в виде небольших округлых узелков у места разветвления корней и на корневых волосках, а у люпина, фасоли, пшеницы и других они имеют вид коротких бородавчатых наростов толщиной в несколько сантиметров (рис. 82).

Взаимоотношения бактерий и бобовых растений настолько тесны, а оба организма в этом симбиозе настолько зависят друг от друга, что процесс усвоения азота из атмосферы осуществляется как бы одним сложным организмом. Бактерии получают от растений углеводы, обеспечивая растения азотистыми соединениями.

Благодаря такой совместной деятельности бобового растения и клубеньковых бактерий неисчерпаемые запасы азота ввиду становятся доступными растениям и накапливаются в почве. По подсчетам академика Д. Н. Прянишникова, клевер при хорошем урожае накапливает за вегетационный период около 150 кг азота, люцерна — 300, люпин — около 160 кг на 1 га. Однолетние бобовые растения (горох, вики, фасоль, соя) накапливают в почве от 60 до 100 кг азота на 1 га.

Клубеньковые бактерии — облигатные аэробы, имеют вид небольших, слегка изогнутых, подвижных палочек с закругленными концами, спор не образуют. В молодых культурах размер их колеблется от $0,5 \times 1$ до 1×7 мкм. Наряду с палочковидными встречаются очень мелкие подвижные кокковидные формы — жемчужки, а также крупные, сильно раздутые, колбообразные, грушевидные или удлиненные ветвистые клетки, называемые

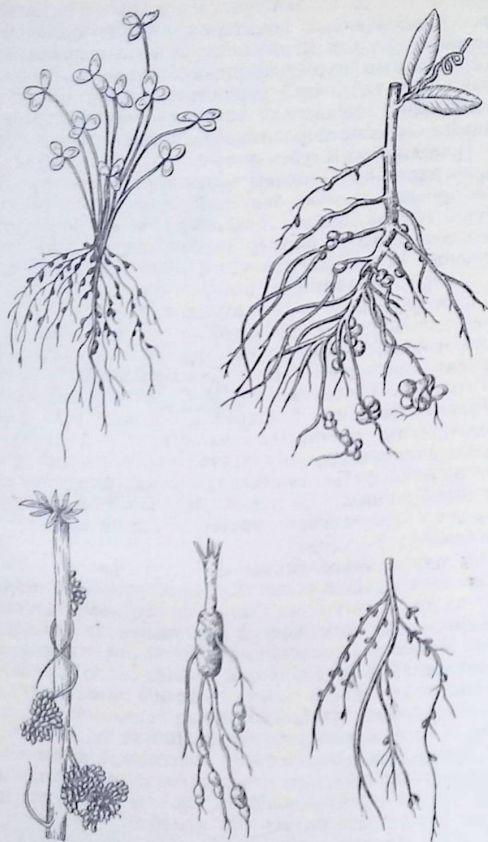


Рис. 82. Форма и размеры клубеньков на корнях растений

мые бактероидами (рис. 83). Считают, что именно в этой бактероидной форме клубеньковые бактерии наиболее энергично усваивают азот из атмосферы. Движение молодых бактерий осуществляется с помощью жгутиков, расположенных у различных видов неодинаково. У одних клубеньковых бактерий имеется несколько жгутиков, отходящих с обеих сторон клетки, у других — один, отходящий от конца клетки под прямым углом.

Клубеньковые бактерии отдельных видов растений имеют некоторое разнообразие морфологических форм. Так, клубеньковые бактерии клевера, более толстые и короткие (до 2 мкм), покрыты слизью; у гороха и вики длина палочек достигает 3,5—4 мкм, а крупные бактерии люпина и фасоли (3,5 мкм) сильно изогнуты и покрыты слизью. Бактерии люцерны, клевера и фасоли имеют в препаратах характерное звездчатое расположение клеток.



Рис. 83. Клубеньковые бактерии

Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью вступать в симбиотические взаимоотношения с различными бобовыми растениями. Так, определенный вид бактерий образует клубеньки и активно фиксирует азот только с определенным видом или группой видов бобовых растений. На других же видах они совсем не образуют или образуют очень мелкие клубеньки, в которых не происходит заметной фиксации азота. На основании специфичности симбиоза с определенным бобовым растением все клубеньковые бактерии разбиты на ряд видов: бактерии гороха — *Rhizobium leguminosarum*, фасоли — *Rhiz. phaseoli*, сои — *Rhiz. japonicum*, люпина — *Rhiz. lupini*, вигны — *Rhiz. vigna*, нута — *Rhiz. cicer*, клевера — *Rhiz. trifolii*, люцерны — *Rhiz. meliloti*, эспарцета — *Rhiz. simplor*, лядвенца — *Rhiz. lotus*, акации — *Rhiz. robinii*.

Большое значение имеет вирулентность культур *Rhizobium*. Энергичное усвоение азота может быть лишь в том случае, если растение инфицируется вирулентной культурой клубеньковых бактерий, обладающих высокой азотфиксирующей активностью.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Свежие или фиксированные корни различных бобовых растений, микроскоп, краски, стекла, спирт 96%, раствор сулемы 1:1000, чашки Петри стерильные, бактериологическая петля, ножницы, скальпель, водяная баня.

Задание 1. Ознакомиться с формой клубеньков у разных бобовых растений в фиксированных препаратах.

2. Выделить клубеньковые бактерии в чистую культуру.

3. Изучить морфологические особенности клубеньковых бактерий различных бобовых растений в гистосрезах или в мазках, приготовленных из клубеньков.

Методические указания. Для ознакомления с формой клубеньков студентам выдаются банки с фиксированными формалином корнями различных бобовых растений. Студенты зарисовывают форму клубеньков и их расположение на корнях.

Для выделения клубеньковых бактерий в чистую культуру производят посев из свежего клубенька¹ на питательную среду следующего состава:

Бобовый бульон (из 100 г гороха)	1000 мл
Манинит (или сахароза)	10 г
Калий кислый фосфорнокислый	1,0 г
Агар	15 г

Среду разливают по пробиркам (по 15—20 мл) и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин.

Для посева выбирают свежий корень бобового растения с хорошо развитыми клубеньками. Корень промывают в воде и отрезают от него наиболее крупные клубеньки. Для уничтожения поверхностной микрофлоры

¹ При отсутствии свежих корней бобовых растений с живыми бактериями выделение культуры можно сделать из нитрагина.

ры клубеньки помещают на 5 мин в 0,1%-ный раствор сулемы, а затем промывают стерильной водой и спиртом. Остатки спирта с клубенька удаляют фильтровальной бумагой и обжиганием.

Обработанные клубеньки переносят стерильным пинцетом в стерильную чашку Петри или на предметное стекло и разрезают на мелкие части стерильным скальпелем. Бактериологической петлей берут кусочек клубенька или его содержимое и вносят в пробирку с расплавленной и охлажденной до 35—40° С питательной средой. После хорошего перемешивания материала среду выливают в стерильную чашку Петри. Чашки с посевом помещают в термостат с температурой 25° С. Через несколько дней на поверхности питательной среды появляется рост клубеньковых бактерий в виде мелких, беловатых, слизистых колоний (*Bac. radicicola*).

Для изучения бактерий, содержащихся в клубеньках, готовят гистосрезы или мазки.

При изготовлении гистопрепарата делают срез клубенька острой ботанической бритвой или микротомом. Срез помещают в каплю воды на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом — сначала при малом, а затем при большом увеличении. Внутри клеток клубенька видны мелкие палочки или бактериоиды клубеньковых бактерий. Для лучшей видимости бактерий препарат можно подкрашивать фуксином или метиленовым синим.

Для приготовления мазка поступают следующим образом: 1) разрезают клубенок на две части. Место разреза многократно протыкают препаровальной иглой для разрушения клеток клубенька; 2) из разрушенного клубенька отжимают капельку жидкости на предметное стекло, разбавляют ее каплей стерильной воды и готовят мазок. Мазок подсушивают, фиксируют на пламени, окрашивают фуксином или метиленовым синим и исследуют под микроскопом.

На препарате хорошо видна морфология клубеньковых бактерий.

Превращение серы

Сера входит в состав таких аминокислот белков растений и животных, как метионин, цистин, а также в состав некоторых витаминов группы В (тиамин, био-

тин). В почве сера встречается в форме сульфатов ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Na_2SO_4 ; K_2SO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), сульфидов (FeS_2 ; Na_2S ; ZnS и др.) и органических соединений.

Основную роль в круговороте серы играют биологические процессы, вызываемые микроорганизмами при разложении растительных и животных остатков.

Преобразования веществ, содержащих серу, состоят в основном из двух процессов: 1) восстановления органических и неорганических соединений серы до сероводорода; 2) окисления восстановленных соединений серы до серы и серной кислоты.

Восстановление неорганических соединений серы до сероводорода. Восстановление сульфатов происходит при сопряженном окислении органических соединений десульфуризирующими бактериями и имеет для них энергетическое значение. Эти бактерии являются облигатными анаэробами, гетеротрофами. В качестве источника углерода они используют углеводы, органические кислоты, жиры, различные углеводороды нефти, нафталин и некоторые азотистые соединения. Выделяющийся при восстановлении сульфатов сероводород образует с железом черную массу коллоидного гидрата сернистого железа, который выпадает в осадок на дно водоемов. Металлические трубы канализации и оросительных систем под влиянием этих бактерий подвергаются коррозии и приходят в негодность.

В случае накопления сероводорода в почве или в воде растения быстро погибают вследствие токсичности H_2S .

Возбудителями процесса являются бактерии, относящиеся преимущественно к роду *Desulfovibrio*.

Desulfovibrio desulfuricans — небольшая слабоизвитая палочка, имеющая форму вибриона. Жгутик расположен на одном полюсе. Оптимум pH лежит в пределах 5,5—8,5. Оптимум температуры 25—30°С. Это облигатный анаэроб, гетеротроф. При дегидрогенизации органических веществ водород переносится на сульфаты, сульфиты и тиосульфаты, которые восстанавливаются до H_2S .

Vibrio desulfuricans — подвижный вибрион, размеры клеток которого колеблются в пределах $2-4 \times 0,7-0,9$ мкм с одним или несколькими полярно расположенными жгутиками. Образует споры. Колонии бесцветные, гладкие, блестящие, плоские или слегка выпуклые. Тем-

пературный оптимум 25° С. Широко распространен в сточных водах, илах, грязях и пр. Развитие десульфуризирующих бактерий в культурах может быть легко распознано по образованию черного осадка вокруг колоний, почернению среды и осаждению гидрата сернистого железа на дне и стенках в жидких культурах (рис. 84).

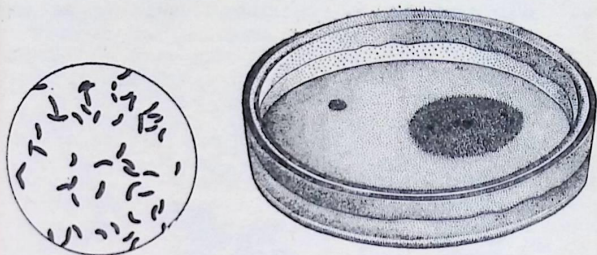


Рис. 84. Чистая культура *Vibrio desulfuricans* и колония десульфуризирующих бактерий на агаре

Окисление восстановленных соединений серы. Бактерии, окисляющие сероводород, серу и другие сернистые соединения, широко распространены в различных типах почв, в водоемах и сточных водах. В результате их жизнедеятельности образуются сернокислые соли, хорошо усваиваемые растениями. Окисление восстановленных соединений серы осуществляется многочисленными видами автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов, отличающихся друг от друга как морфофизиологическими свойствами, так и биохимизмом превращений.

Из автотрофных микроорганизмов, окисляющих восстановленные соединения серы, наибольшее значение имеют хемоавтотрофные бактерии рода *Thiobacillus*; нитчатые хемоавтотрофы из родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca* и др.; фотосинтезирующие зеленые и пурпурные бактерии.

Представители первой группы — тионовые серобактерии (*Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus ferrooxi-*

dans) широко распространены в почвах. Они представляют собой небольшие (1—3 мкм) подвижные бесспорные грамотрицательные палочки с одним полярно расположенным жгутиком, аэробы. Окисляют серу, сероводород, сульфиды, тиосульфаты, тетратионаты и тиоцианаты до серы и до SO_4 .

Нитчатые серобактерии представляют собой бесцветные нити, состоящие из цилиндрических клеток (рис. 85). Они больше напоминают нитчатые водорос-

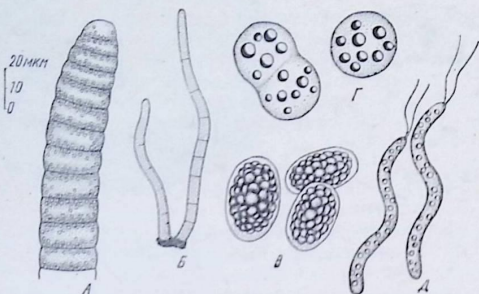


Рис. 85. Серобактерии: А — *Beggiatoa mirabilis*; Б — *Thiothrix nivea*; В — *Achromatium oxaliferum*; Г — *Thiophysa macrophysa*; Д — *Thiospira winogradskii*

ли, но не имеют пигментов. Обитают в серных источниках и в загрязненных водоемах. Бактерии рода *Beggiatoa* имеют крупные, иногда гигантские формы диаметром до 10 мкм. Они свободно плавают в воде. Источником углерода для *Beggiatoa* служит усваиваемая углекислота, а для получения энергии они окисляют сульфиды до элементарной серы, которая откладывается внутри клеток в виде аморфных капелек. Нити бактерий *Thiothrix* прикрепляются к подводным предметам при помощи специальных слизистых подушечек. В чистой культуре получить представителей этих родов очень трудно.

Среди представителей других серобактерий встречаются спириллы, шаровидные и палочковидные формы.

К фотосинтезирующим бактериям относят зеленые и пурпурные серобактерии. Зеленые серные бактерии (семейство *Chlorobacteriaceae*) представляют собой мелкие неподвижные палочки с закругленными концами. Представители пурпурных бактерий (семейство *Thiorodoceae*) имеют округлую, эллипсовидную, палочковидную и извитую формы. Размер клеток варьирует от 1—2 до 25—50 и даже 100 мкм. Некоторые представители семейства обладают подвижностью.

Бактерии этих семейств содержат пигмент бактериохлорофилл и бактериопурпурин. Они способны к фотосинтезу в анаэробных условиях в присутствии сероводорода. Восстановление углекислоты в процессе фотосинтеза происходит при сопряженном окислении сероводорода до серы и серной кислоты.

Из гетеротрофных микроорганизмов в окислении соединений серы участвуют *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis*, ряд актиномицетов и дрожжей. Окисление серы для них служит побочным процессом в главном метаболизме.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Колбы плоскодонные с притертыми пробками на 100 мл или пробирки высокие (150×20 мм) со средой Таусона, пробки ватные к ним, завернутые в бумагу притертые или резиновые пробки на ниточках, стерильный раствор соли Мора, градуированные пипетки на 1—2 мл, навеска почвы или образцы исследуемой воды, железный купорос, пинцеты, расплавленный парафин, колбы с мясо-пептонным агаром, смесь углекислого свинца с гумминарабиком, стерильные чашки Петри, микроскоп, предметные и покровные стекла.

Методические указания. Для постановки накопительной культуры сульфатвосстанавливающих бактерий можно воспользоваться жидкой средой В. О. Таусона (в модификации Л. Д. Штурм):

Кальций молочнокислый (можно натрий)	3,5 г
Аммоний сернокислый	4,0 г
Калий кислый фосфорнокислый	0,5 г
Магний сернокислый	1,0 г
Кальций сернокислый	0,5 г
Соль Мора	0,5 г
Вода водопроводная (из водоема)	1000 мл

Усреднение среды проводят раствором едкого кали до pH 7,0. Соль Мора стерилизуют отдельно и добавляют в среду перед посевом.

А. А. Имшенецкий указывает, что эта среда является оптимальной для развития десульфуризирующих бактерий при добавлении к ней 1% дрожжевой воды.

Десульфуризирующие бактерии можно выращивать в колбочках с притертыми пробками или в больших пробирках (150×20 мм) с плотно подогнанными каучуковыми пробками. Колбочки или пробирки наполняют на $\frac{3}{4}$ питательной средой, закрывают ватными пробками, а к горлышку подвязывают ниткой тщательно завернутую в бумагу стеклянную или резиновую пробку. Колбочки (пробирки) со средой стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин. Перед посевом в каждую колбочку добавляют маленький кристаллик железного купороса, обожженного в пламени горелки. В среду вносят небольшое количество почвы (0,2 г) или сточной воды (0,5 мл). После посева колбочки (пробирки) доливают доверху стерильной средой и закрывают над пламенем стерильными притертыми или резиновыми пробками. Для полной герметичности пробки сверху заливают расплавленным парафином. Необходимо следить за тем, чтобы под пробкой не осталось пузырьков воздуха. Посевы помещают в термостат при температуре 25—30°С и выдерживают 2—3 недели. При микроскопировании осадка из таких накопительных культур удастся обнаружить в большом количестве типичные вибрионы — *Vibrio desulfuricans*. Восстановление сульфатов можно установить по характерному запаху H_2S и по почернению среды за счет образования сернистого железа.

Обнаружение сульфатовосстанавливающих бактерий можно проводить на плотных средах. В стерильный расплавленный мясо-пептонный агар в колбе добавляют 0,5% углекислого свинца, мелко растертого в ступке с гуммиарабиком (на 2—3 г соли берут 0,5 г гуммиарабика и тщательно растирают пестиком в стерильной фарфоровой ступке). Среду хорошо перемешивают и охлаждают до 45°С. В стерильные чашки Петри вносят посевной материал (измельченная почва, сточная вода) и заливают приготовленным агаром. Вращательными движениями хорошо перемешивают агар в чаш-

ках с посевным материалом. После застывания агара чашки помещают в термостат при температуре 25° С. Через 5—6 сут в чашках появляются темные пятнышки — колонии бактерий, восстанавливающих сульфаты. При развитии бактерий, выделяющих сероводород, вокруг колоний образуются бурые, почти черные зоны вследствие образования сернистого свинца.

Превращение фосфора

Фосфор является одним из важнейших элементов, необходимых для питания растений. Он входит в состав белков, фитина, лецитина, различных инозитфосфатов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, гумусовых соединений почвы, принимает участие в процессах фосфорилирования углеводов и образовании веществ, богатых энергией.

Большая часть фосфора находится в почве в форме соединений, недоступных для усвоения высшими растениями. Эти соединения представлены в почвах или сложными фосфатами органических веществ, или плохо растворимыми неорганическими соединениями типа фосфатов алюминия, железа или кальция. Фосфор ряда органических и минеральных удобрений (фосфорит, апатит) также недоступен растениям.

При разложении белковых веществ гнилостными бактериями фосфорорганические соединения постепенно расщепляются и переходят в форму фосфорной кислоты. Последняя связывается основаниями почвы, образуя труднорастворимые и малопригодные для питания растений соли кальция, магния, железа, алюминия и др.

Минерализация основной массы органофосфатов, нуклеопротеидов и растворение алюмо-, ферро- и трехкальциевого фосфатов, их превращение в доступную для растений форму происходит в результате деятельности почвенных, ризосферных, прикорневых и корневых микроорганизмов. При минерализации органофосфатов происходит гидролитическое отщепление фосфорной кислоты от органических соединений и нуклеиновых кислот. Разложение фосфатидов происходит также путем гидролиза. Сначала образуются фосфорные эфиры, а затем идет распад с освобождением фосфорной кислоты.

Растворению фосфатов способствуют различные

органические и кетокислоты, образующиеся при неполном окислении углеводов или при их брожении; азотная кислота, образуемая нитрифицирующими бактериями, и серная кислота, образуемая сероокисляющими бактериями.

В разложении органических соединений фосфора и неорганических фосфатов принимают участие представители различных групп микроорганизмов: бактерии из родов *Pseudomonas* и *Bacillus* (*Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*), грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, некоторые актиномицеты и дрожжи.

Типичным представителем фосфорных бацилл являются *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*. Они представляют собой крупные палочки с закругленными кон-



Рис. 86. Зоны растворения мела вокруг колоний бактерий, разлагающих органические соединения фосфора

цами, плотной оболочкой и зернистой протоплазмой. Размеры клеток варьируют в пределах 5—6 мкм в длину и 1,5—2 мкм в диаметре. В молодой культуре клетки расположены одиночно и слабо подвижны; при старении они располагаются попарно или короткими цепочками и утрачивают подвижность. Клетки образуют овальные эндоспores, расположенные у одного конца. По Граму красятся положительно, аэробы, оптимум температуры 27—35° С. На плотных средах

образуют грязновато-белые колонии, которые при старении приобретают желтую или бурую окраску. На среде, содержащей фосфорорганические соединения и мел, вокруг колоний образуются зоны просветления за счет растворения мела фосфорной кислотой (рис. 86).

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Стерильные чашки Петри, пробирки с 9 мл стерильной воды (по 5 шт. на студента),

навески почвы, расплавленный с лецитином 1%-ный раствор фенола, пипетки, градуированные на 1—2 мл, микроскоп, предметные стекла, краски.

Методические указания. Выявление в почве фосфор-минерализующих бактерий можно проводить на агаризованной среде (по Р. А. Менкиной):

Вода дистиллированная	1000 мл
Аммоний сернокислый	0,5 г
Натрий хлористый	0,3 г
Калий хлористый	0,3 г
Магний сернокислый	0,3 г
Железо сернокислосое	следы
Марганец сернокислый	следы
Глюкоза	10,0 г
Мел	5,0 г

Для уплотнения среды вносят 1,5—2% агара, а в качестве источника органического фосфора вносят лецитин или нуклеиновые кислоты из расчета 3—5 мг P_2O_5 на 25 мл среды (0,056 г лецитина или 0,025 г нуклеиновой кислоты). Лецитин предварительно растворяют в 96%-ном спирте. Среду стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 20—30 мин. Для подавления сопутствующей микрофлоры в среду перед разливом по чашкам рекомендуют добавлять 1%-ный раствор фенола из расчета 50 мл/л.

Для выявления фосфорных бактерий из почвы делают 5—7 последовательных десятикратных разведений в пробирках. В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл суспензии из последних разведений. Заливают суспензию охлажденным до 45°С агаром после его хорошего перемешивания. Вращательными движениями перемешивают агар с суспензией в чашке. Чашки с застывшим агаром помещают в термостат при температуре 27—35°С. Через 6—7 сут на месте роста фосформинерализующих бактерий появляются резко очерченные грязно-белые колонии фосфорных бактерий, окруженные прозрачным ореолом за счет растворения мела вокруг них. При микроскопическом изучении окрашенного мазка из типичных колоний находят крупные с закругленными концами спорообразующие клетки фосфорных бактерий.

Глава VIII

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Бактериальные удобрения

Значительные успехи, достигнутые в изучении физиологии и биологии азотобактера, клубеньковых бактерий, фосформинерализующих и других микроорганизмов, участвующих в минерализации органических остатков и синтезе биологически активных веществ, повышающих урожай сельскохозяйственных культур, позволили создать бактериальные земледобрительные препараты, называемые бактериальными удобрениями.

Бактериальные удобрения представляют собой чистую культуру живых, наиболее активных штаммов азотфиксирующих, фосформинерализующих или других бактерий, выращенных на питательной среде. Механизм действия этих препаратов состоит в том, что входящие в их состав бактерии, внесенные в почву вместе с семенами, размножаются в ризосфере, на корнях или в корнях растений и в процессе своей жизнедеятельности проявляют полезные для растений свойства.

Бактериальные удобрения способствуют улучшению корневого питания различных сельскохозяйственных культур и повышению их урожаев, активизируют жизнедеятельность других микроорганизмов, оказывающих стимулирующее влияние на питание, рост и развитие растений, выполняют защитную функцию, оказывая антагонистическое влияние на некоторые фитопатогенные микробы и грибы.

Успех использования бактериальных удобрений зависит от приживаемости культур в корнях или в зоне корней растений, так как только при размножении микроорганизмов будут накапливаться продукты их жизнедеятельности, влияющие на почвенную среду и на растение. На приживаемость вносимых с удобрениями микроорганизмов оказывают большое влияние микробы-антагонисты, активно размножающиеся в зоне корней

растений, органо-минеральный состав почвы, ее pH, влажность, температура и другие факторы.

В Советском Союзе готовят в основном три вида бактериальных удобрений: азотобактерин, нитрагин и фосфобактерин.

Азотобактерин — чистая культура свободноживущих в почве азотфиксирующих бактерий, чаще всего *Azotobacter chroococcum*, выращенная на агаровых питательных средах или на стерильной почве.

Азотобактерин предназначен для улучшения азотного питания растений за счет фиксации азота атмосферы. Кроме обогащения почвы азотом за счет связывания его молекулярных форм азотобактер выделяет в почву физиологически активные вещества (ауксины, гиббереллиноподобные вещества, витамины), стимулирующие рост растений. Этим микроорганизмом вырабатываются вещества, усиливающие жизнедеятельность и физиологическую активность многих почвенных микроорганизмов, участвующих в минерализации органических веществ почвы.

Техника изготовления азотобактерина заключается в выращивании чистой культуры *Azotobacter chroococcum* на питательной среде. Питательной средой для изготовления агарового азотобактерина служат растворимые в воде минеральные соли (за исключением азотных), сахар, микроэлементы и мел. Для придания плотности в среду добавляют 2% агара.

Питательную среду разливают по 200 мл в молочные бутылки (0,5 л) и стерилизуют в автоклаве при 1 атм 30 мин. После стерилизации бутылки с горячей средой кладут в наклонном положении для получения скошенного агара. Чистую культуру азотобактера асептически вносят в бутылку петлей и равномерно распределяют по всей поверхности скошенного агара. Бутылки с засеянной питательной средой выдерживают в термостате при температуре 25—27° С в течение 4—6 дн. Азотобактер образует на поверхности агара сплошной слизистый рост, имеющий вначале беловатую окраску, с течением времени переходящую в темно-коричневую. При выпуске с завода в бутылке должно быть не менее 40 млрд. клеток азотобактера. Срок годности — 3 мес со дня изготовления.

В последние годы наши заводы, выпускающие бактериальные удобрения, перешли на изготовление сухого

азотобактерина. Для этого азотобактер выращивают на жидкой питательной среде глубинным методом при постоянной аэрации. Путем сепарирования на специальных центрифугах биомассу азотобактера отделяют от питательной среды. В специальных сушилках высушивают бактериальную массу, а затем смешивают с порошком каолина. В 1 г такого препарата должно содержаться не менее 10 млрд. активных клеток азотобактера.

Сухим азотобактерином опудривают семена. Он дольше сохраняется по сравнению с почвенными и агаровыми препаратами, более удобен в транспортировке, позволяет использовать средства механизации для бактеризации семян.

Азотобактерин применяют под зерновые, технические, овощные культуры и под картофель.

Нитрагин — чистая культура клубеньковых бактерий, выращенная на специальных питательных средах и смешанная с почвой или торфом.

Для производства нитрагина употребляют хорошо окультуренную почву с большим содержанием органического вещества. Для улучшения физических свойств к почве добавляют песок (до 30% от массы почвы) и мел — для доведения pH до 6,6—7,0. Почву расфасовывают в молочные бутылки (0,5 л) по 450—500 г при влажности 35—40% от полной влагоемкости. Бутылки с почвой стерилизуют в автоклаве при 2 атм в течение 2 ч. Проверяют стерильность почвы (выборочно). Одновременно выращивают клубеньковые бактерии на минеральной среде с сахаром и гороховым или фасолевым отваром. Размножение маточной культуры производят в бутылках емкостью 3—5 л при постоянном встряхивании на качалках или в специальных ферментерах при непрерывном аэрировании питательной среды.

Выращенной и проверенной на чистоту маточной взвесью заражают почву в бутылках. Бутылки с почвой выдерживают в термостате с температурой 20—25° С в течение 4—6 дн при заражении быстрорастущими бактериями и 10—11 дн при заражении культурами медленно растущих бактерий. В 1 г готового нитрагина для быстрорастущих клубеньковых бактерий (клевера, гороха, вики, люцерны) должно быть не менее 300 млн., а для медленно растущих бактерий (люпина, сои и др.) — не менее 70 млн. клеток.

В настоящее время разработана технология изготовления сухого нитрагина. Основные процессы его производства аналогичны процессам изготовления азотобактерина. В 1 г сухого препарата нитрагина должно содержаться не менее 10 млрд. клеток клубеньковых бактерий. Бактеризацию семян сухим нитрагином можно проводить в машинах, используемых для протравливания семян.

Нитрагин применяют для повышения урожайности различных бобовых культур. В связи с большой специфичностью клубеньковых бактерий следует применять для предпосевной обработки семян определенных бобовых растений только тот нитрагин, который изготовлен из культуры бактерий, приспособившихся к развитию на корнях данных растений.

Фосфоробактерин изготавливается из чистых культур бактерий, активно минерализующих органические фосфорсодержащие соединения. Чаще всего для этих целей используются *Bac. megatherium* var. *phosphaticum* (рис. 87). Это крупные (1,5—2×5—6 мкм) спорообра-

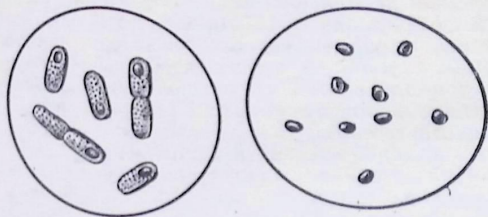


Рис. 87. Вегетативные клетки и споры фосфорных бактерий

зующие, в молодой культуре подвижные палочки с закругленными концами. В ранней стадии размножения клетки расположены одиночно, в старых культурах — попарно или в виде коротких цепочек. Клетка имеет плотную оболочку с зернистой протоплазмой. На плотных средах образует грязновато-белые, темнеющие впоследствии, резко очерченные колонии. На средах, содержащих фосфорорганические соединения и мел,

вокруг колонии образуются зоны просветления под влиянием образующихся кислот.

Для производства фосфобактерина используют минеральные среды с мяясой и растительными экстрактами. Выращивают микроорганизмы в специальных ферментерах до перехода вегетативных клеток в спорую форму. Затем накопленную массу спор отделяют от жидкости в специальных сепараторных центрифугах. Жидкость, свободную от спор, выбрасывают, а споры в виде густой массы собирают со стенок сепаратора. В 1 г такой маточной пасты должно содержаться 150—200 млрд. спор.

Полученную маточную пасту высушивают в специальных сушильных аппаратах — сублиматорах, температура в которых поддерживается в пределах минус 20—25° С. Досушивают пасту при положительной температуре до 2—3% остаточной влажности.

Высушенную культуру микроба смешивают с наполнителем (каолин), расфасовывают в картонные коробки по 50 и 100 г и рассылают для применения. В 1 г порошкообразного фосфобактерина должно содержаться не менее 8 млрд. спор. Кроме того, готовят жидкий фосфобактерин. Применяют фосфобактерин под яровые и озимые зерновые культуры, под кукурузу, картофель, хлопок и другие культуры. Бактеризацию семян проводят водной суспензией спор или опылением в машинах, используемых для протравливания семян. Бактеризацию семян азотобактерином и нитрагином проводят в день посева, а сухим фосфобактерином бактеризовать семена можно как в день посева, так и за несколько месяцев до него или одновременно с обработкой семян ядохимикатами.

Для обработки семян рассыпают тонким слоем в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Нужное количество сухого азотобактерина, нитрагина или фосфобактерина высыпают в чистую посуду и смешивают с водой. Количество воды зависит от величины семян. На 100 кг мелких семян расходуют 3—5 л воды, крупных — 1 л. Агаровый азотобактерин перед использованием смывают водой.

Полученной суспензией бактериального удобрения поливают семена и хорошо перелопачивают их. Для обработки гектарной порции семян расходуют в среднем азотобактерина почвенного 3—6 кг, агарового 0,5—1 л,

нитрагина почвенного 500 г, агарового 1—0,5 л; фосфобактерина жидкого 50 мл на гектарную порцию зерновых культур и 150 мл на картофель; сухой фосфобактерин вносят из расчета 5 г/га под зерновые и 15 г/га под кукурузу, хлопок, картофель и овощные культуры.

Бактеризацию семян необходимо производить через 2—3 дн. после их протравливания ядохимикатами. Высевают бактеризованные семена сразу после обработки.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Бактериальные препараты в заводской упаковке, пробирки с расплавленной питательной средой и физиологическим раствором, стерильные чашки Петри, микроскоп, стекла, краски, бактериологическая петля, пробирки с взвесью культур из азотобактерина, нитрагина и фосфобактерина.

Задание 1. Изучить микробиологические основы и технику изготовления бактериальных удобрений.

2. Ознакомиться с технологией применения удобрений.

3. Ознакомиться с морфологией культур, применяемых для изготовления удобрений (мазок).

4. Определить количество живых клеток в азотобактерине, нитрагине и фосфобактерине.

Методические указания. Для изучения морфологии культур, применяемых для изготовления азотобактерина, нитрагина и фосфобактерина, готовят мазки из суспензии, приготовленной из удобрений, затем окрашивают фуксином или метиленовым синим и просматривают под микроскопом.

Для определения количества живых клеток делают посев из удобрений на питательные среды.

Определение количества живых бактерий в азотобактерине. В бутылку с агаровым азотобактерином наливают 200 мл стерильной воды, слегка встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1 ч. Бутылку периодически встряхивают. Если бактерии не смыли с агара, то бутылку помещают на качалку и энергично встряхивают в течение 5—10 мин.

Из полученной взвеси отбирают пипеткой 10 мл и переносят в колбу с 90 мл стерильной воды (разведения 10^{-1}). После энергичного встряхивания из получен-

ной суспензии готовят последующие разведения от 10^{-2} до 10^{-10} . Из двух последних разведений стерильной пипеткой берут и вносят по 1 мл суспензии в две параллельные стерильные чашки Петри. Чашки заливают 40 мл расплавленного и охлажденного до 45°C агара Эшби. Круговыми движениями хорошо перемешивают содержимое чашек и оставляют их на столе для застывания агара. Чашки с посевом переворачивают дном вверх и ставят для проращивания в термостат при $26-28^{\circ}\text{C}$. Количество живых клеток азотобактера определяют по количеству колоний, выросших в среде на 3—4-е сутки. Для этого пользуются формулой $x = K \cdot P \cdot 200$, где K — среднее количество колоний на чашке, P — степень разведения, 200 — количество воды, внесенное в бутылку для мытья. В течение срока годности в одной бутылке должно быть не менее 15 млрд. живых клеток азотобактера.

Численность посторонней микрофлоры в азотобактерине устанавливают посевом 1 мл суспензии на чашки с мясо-пептонным агаром. Учет проводят через 48 ч.

Определение количества живых бактерий в сухом нитрагине. 10 г сухого нитрагина вносят в колбу с 90 мл стерильной воды. Колбу встряхивают через каждые 15—20 мин 3—4 раза. Из полученной суспензии готовят ряд десятикратных разведений от 10^{-2} до 10^{-9} . Из последних двух разведений делают посев по 1 мл суспензии на две параллельные чашки Петри и заливают их расплавленным бобовым агаром (для быстрорастущих клубеньковых бактерий) или маннитно-дрожжевым агаром (для медленно растущих бактерий). Чашки с посевами помещают в термостат при 28°C . Учет количества живых клеток быстрорастущих клубеньковых бактерий производят по количеству выросших колоний на 3—4-й день, а медленно растущих — на 7—9-й день после посева. Расчет ведут по формуле, приведенной в методике определения азотобактера с умножением на 100. Наряду с учетом количества живых клубеньковых бактерий определяют количество посторонних микроорганизмов посевом из разведений на мясо-пептонный агар.

Определение количества живых клеток в фосфобактерине. 1 г фосфобактерина вносят в колбу с 99 мл стерильной воды. Колбу выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая ее в течение 1—2 мин. Из полученной сус-

пензии готовят ряд последовательных разведений от 10^{-3} до 10^{-9} . Из последних 2—3 разведений вносят в параллельные стерильные чашки по 1 мл суспензии и заливают 20 мл расплавленного мясо-пептонного агара, охлажденного до 45°C . После застывания агара чашки с посевом помещают в термостат при $30\text{—}35^{\circ}\text{C}$. Учет количества выросших колоний производят через 24 ч инкубации.

Количество живых клеток вычисляют по формуле, приведенной выше. В 1 г фосфобактерина к концу срока годности должно быть не менее 6 млрд. живых клеток *Bac. megatherium*. Количество живых клеток посторонней микрофлоры во всех бактериальных удобрениях не должно превышать 1% от количества живых клеток удобрений.

Использование микроорганизмов для борьбы с вредителями растений

Забота о питании — одна из насущных проблем человечества. С развитием цивилизации, с ускорением роста населения нашей планеты эта проблема становится все более острой и актуальной. Ее решение зависит от правильной и планомерной борьбы за неуклонный рост урожайности всех сельскохозяйственных культур, за увеличение валовых сборов продуктов земледелия и животноводства.

В последние годы во всем мире неуклонно усиливается внимание к разработке биологических средств борьбы с вредителями сельскохозяйственных, технических, плодовых культур и леса. Биологические инсектициды при своей высокой специфичности и эффективности позволяют избежать многих нежелательных изменений в биоценозах, устранить загрязнение окружающей среды, они безвредны для растений, животных и человека.

Микробиологические препараты, изготовленные в промышленных условиях, уже широко используются для борьбы более чем со 160 видами вредных насекомых. По виду микроорганизмов, на основе которых они производятся, биологические инсектициды подразделяют на несколько групп:

а) бактериальные инсектициды — изготовляют на основе патогенных для насекомых или грызунов

бактерий. С зараженной пищей бактерии и их токсины попадают в пищеварительный тракт восприимчивых насекомых. Токсины вызывают поражения клеток слизистой оболочки кишечника. Через поврежденную стенку кишечника легко проникает в гемолимфу насекомых содержимое кишечника и бактерии. Насекомое погибает;

б) грибов — производят на основе спор микроскопических грибов. Споры грибов, попадая на наружные покровы тела насекомых, прорастают внутрь и вызывают гибель насекомого;

в) вирусные — на основе вирусов патогенных для насекомых. Попадая внутрь насекомых с пищей, вирусы проникают в ткани, размножаются и вызывают гибель насекомого.

г) нематоды — на основе микроскопических нематод. Наиболее перспективны в борьбе с растительноядными насекомыми — неоплектанами.

Несмотря на то, что существуют инсектициды, производимые из бактерий, защита растений в нашей стране. Активным началом этих препаратов являются споры, токсинообразующие в группу *Bacillus*

Энтомопатогенный микроорганизм (бацилла), на основе которого производится этот препарат, выделен из гусениц насекомого, поражающего пчелиные ульи, — большой пчелиной огневки — галлерия мелонелла (*Galleria melonella*). От названия насекомого происходит и название бациллы — *Bac. thuringiensis* var. *galleria*. Микроорганизм образует только споры и кристаллы. В связи с этим механизм действия энтобактерина на вредное насекомое складывается из одновременного действия спор и кристаллов, которые заглатываются при питании вместе с кормом — листьями растений и нанесенным на них препаратом. Кристаллы вызывают паралич клеток пищеварительного тракта этих насекомых-вредителей, и они уже через несколько часов перестают питаться, а затем погибают.

Технология производства сухого энтобактерина в промышленности включает несколько этапов: размножение бактерий на питательной среде в пробирках; приготовление посевного материала в посевных аппа-

ратах; засев посевного материала на питательную среду в ферментеры; выращивание биомассы в течение 28—32 ч при определенной температуре, в анаэробных условиях, с перемешиванием; отделение биомассы от культуральной жидкости на сепараторах; высушивание пасты на распылительной сушилке; определение качества и стандартизации препарата путем смешивания его с наполнителем; расфасовка препарата. Процесс идет в стерильных условиях. Качество препарата оценивается по количеству кристаллов и жизнеспособных спор, которых в соответствии с техническими условиями должно содержаться не менее 30 млрд./г. Вирулентность препарата определяется по смертности (ЛД₅₀) тест-объекта — гусениц вошинной моли, которые с этой целью размножаются в лабораторных условиях.

Препарат выпускают в виде порошка серого цвета, состоящего из 10% спор и кристаллов и 90% наполнителя — каолина. Разработан способ его получения в виде пасты со стабилизатором.

Применяется в борьбе с вредителями сада — яблонной, плодовой, рябиновой молями, пяденицами, листовертками, американской белой бабочкой; вредителями овощных культур — капустной и репной белянками, капустной молью. Препарат наносится на растения в виде водной суспензии в количестве 2 кг/га на овощные культуры (при расходе рабочей жидкости 500 л/га) и 5—10 кг/га плодового сада в зависимости от возраста и высоты растений (с расходом рабочей жидкости до 1000 л).

Энтобактерин в борьбе с листогрызущими вредителями овощных культур вполне может заменить ДДТ и другие токсичные для теплокровных химикаты.

Дендробациллин — бактериальный инсектицидный препарат, изготавливаемый на основе культуры бактерий IV серотипа *Bac. thuringiensis* var. *dendrolitum*. Он применяется для борьбы с совками на хлопчатнике: озимой, хлопковой и карадриной. Технология изготовления препарата аналогична технологии изготовления энтобактерина. Препарат представляет собой однородный порошок серовато-розового цвета. Норма расхода препарата на 1 га составляет в среднем 2 кг, разбавленных в 200 л воды. Однако доза препарата может изменяться и зависит от размеров и вида обрабатываемых растений, вида вредителя, системы опрыс-

ктивателя и вида обработки (наземная, с самолета). Дендробациллин хранят в сухих, защищенных от атмосферных осадков помещениях при температуре не выше $+30^{\circ}\text{C}$ и не ниже 15°C . Срок хранения препарата — 1 год с момента его изготовления.

На основе различных серотипов спорообразующих кристаллоносных бактерий *Bac. thuringiensis* в нашей стране налажено промышленное производство целого ряда других бактериальных препаратов. Инсектин — используется I серотип *Bac. thuringiensis*.

При добавлении к спорово-кристаллическому комплексу этого препарата чистого экзотоксина, осажденного и выделенного из культуральной жидкости после роста тех же бактерий, получают токсобактерин (экзотоксин). Добавление к бактериальному препарату очищенного экзотоксина усиливает его эффективность против личиночных форм многих листогрызущих насекомых, особенно вредителей леса. Это обусловлено тем, что активность чистого экзотоксина в 100 раз превышает активность ДДТ (О. А. Алешина, 1975).

Биоинсектицид БИП. На основе бактерий II серотипа *Bac. thur. var. alesti caucasicus* микробиологическая промышленность выпускает биоинсектицид БИП, активно действующий против некоторых видов совок. Технологическая схема изготовления и применения этих препаратов во многом сходна с технологией изготовления энтобактерина.

Сухой зерновой бактороденцид изготавливают на основе культуры бактерий Исаченко или № 5170 Прохорова. Бактороденцид представляет собой сыпучую массу зерна, обсемененного бактериями тифа грызунов *Bac. typhi murium*. Он применяется для борьбы с обыкновенной, общественной, водяной полевками, домовою мышью, черной и серой крысами. Наиболее целесообразно применять его против полевых видов грызунов (мышей, полевок) в скирдах, лесополосах, посевах многолетних трав. Для уничтожения грызунов зараженное зерно разбрасывают или раскладывают в виде приманок вручную. Норма расхода препарата 1—2 кг на 1 га посевов и 5,0—30,0 г на 1 м³ стога сена или соломы. Гибель мышей и полевок от применения препарата составляет 80—100%, серых и черных крыс — 60—80%. Срок годности сухого зернового бактороденцида 1 год с момента изготовления.

Грибные инсектициды. Б о в е р и н — грибной инсектицидный препарат, изготавливаемый на основе культуры энтомопатогенного гриба *Bauveria bassiana*. Он применяется для борьбы с несколькими опасными вредителями сельскохозяйственных и технических культур (озимая совка, луговой и капустный мотылек, златогузка, вредная черепашка и др.), в том числе против колорадского жука и яблонной плодожорки.

Механизм действия боверина, как и других грибных препаратов, иной, чем при использовании энтомопатогенных бактерий. Инфекционным началом у этих препаратов являются споры и мицелий гриба. Попадая на насекомых, споры прорастают, и развивающийся мицелий гриба проникает внутрь насекомого через наружные покровы их тела. Грибница, развиваясь, пронизывает все тело насекомого и образует на его поверхности слой конидиеносцев с конидиоспорами. Насекомое погибает, а конидии разносятся ветром, дождем и больными насекомыми на другие особи, где цикл развития гриба повторяется.

В настоящее время промышленностью используются два способа получения и изготовления боверина: глубинно-поверхностный и глубинный способ культивирования гриба с получением энтомопатогенного материала.

1. Глубинно-поверхностный способ. Мицелий гриба выращивают в ферментерах в жидких питательных средах. После получения хорошего роста мицелий вместе с питательной средой разливают тонким слоем на поверхность больших кюветов. Кюветы выдерживают на стеллажах в термостатной комнате до образования поверхностных конидиоспор. Выросшую массу мицелия и конидиоспоры вместе с остатками питательной среды высушивают, размалывают и смешивают с наполнителем (каолином). Этот способ имеет существенный недостаток: материал получается нестерильный, содержащий много посторонних грибов и бактерий.

2. Глубинный способ. Культивирование гриба производят в ферментерах большой емкости с постоянным аэрированием. В этом случае гриб образует так называемые глубинные конидиоспоры, устойчивые к высушиванию и обладающие высокой энтомопатогенной активностью. Выращенный на питательной среде мицелий и споры отделяют от культуральной жидкости путем

сепарирования. Полученную грибную пасту высушивают, стабилизируют, смешивают с наполнителем и выпускают в виде сухого препарата.

Боверин представляет собой однородный порошок кремового цвета и состоит из смеси конидиоспор гриба с каолином. В 1 г стандартного препарата должно содержаться 2 млрд. конидиоспор. Применяется препарат в виде водной 1%-ной суспензии. При изготовлении рабочей суспензии навеску порошка сначала растирают с небольшим количеством воды до пастообразного состояния. Затем при постоянном помешивании добавляют требуемое количество воды из расчета 400 л на 1 га при дозе боверина 1—2 кг/га. Рабочий раствор готовят непосредственно перед опрыскиванием. Опрыскивание растений производят с помощью любого наземного или авиационного опрыскивателя в период массового появления личинок насекомых второго возраста. Боверин безвреден для человека и теплокровных животных. Рекомендуется применять боверин с малыми дозами (до 25%) химических инсектицидов (хлорофос и др.), которые ослабляют насекомых и обеспечивают высокую (до 100%) эффективность боверина.

Вирусные препараты. Энтомопатогенные вирусы строго специфичны. Они вызывают заболевания и гибель определенных видов насекомых, оставаясь безвредными для человека, животных и полезных насекомых. Особенностью вирусов является их размножение только в живых тканях и клетках восприимчивых организмов. В этой связи технология изготовления вирусных препаратов иная, чем технология изготовления бактериальных и грибных инсектицидов. Для производства вирусных препаратов в лабораторных условиях на искусственных питательных средах выращивают стандартных насекомых. Гусениц насекомых определенного возраста заражают через инфицированный вирусом корм и содержат в строго регулируемых условиях. Погибших от вирусной инфекции гусениц высушивают, измельчают механически для освобождения полиэдров и гранул вируса из ткани, а затем очищают от механических, бактериальных и других примесей. Очищенную вирусную биомассу смешивают со стабилизатором и наполнителем и в виде суспензии расфасовывают в стеклянные или полиэтиленовые баллоны.

Действующим началом вирусных препаратов явля-

ются вирионы (вирусные частицы), заключенные в белковую оболочку. Количество вирионов у различных вирусов неодинаково — от 1—2 до нескольких десятков. Вирионы, лишенные белковой оболочки полиэдра или гранул, очень нестойки и быстро погибают под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды. При обработке растений вирионы заглатываются с пищей питающимися гусеницами насекомыми-вредителями. Под влиянием ферментов щелочной среды пищеварительного тракта насекомых белковая оболочка вируса растворяется, вирусные частицы освобождаются и проникают в ткани и клетки насекомого, нарушая их жизнедеятельность. Насекомые, зараженные вирусом, погибают через одну-две недели. Вирусная инфекция передается от одного поколения насекомых другому, а также распространяется между особями, создавая очаг эпизоотии, который сохраняется в природе несколько лет.

Вирусные препараты могут применяться в чистом виде, а также в смеси с бактериальными, грибными и химическими инсектицидами.

В Советском Союзе производят несколько вирусных препаратов.

Вирин-ЭКС изготавливают на основе вируса ядерного полиэдроза капустной совки. Он представляет собой суспензию серого цвета, состоящую из полиэдров вируса в 50%-ном глицерине. В 1 мл препарата содержится 1 млрд. полиэдров. Вирин-ЭКС применяют для опрыскивания рабочим раствором капусты, сахарной свеклы и других культур, повреждаемых капустной и огородной совкой. Гарантийный срок хранения 1 год с момента изготовления. Хранится в сухих, защищенных от атмосферных осадков помещениях при температуре от 0 до +30°С. Препарат безвреден для человека и животных, а также пчел и других полезных насекомых.

Рабочую жидкость готовят, разбавляя препарат различным количеством воды в зависимости от обрабатываемой культуры — на сахарной свекле 400 л/га, на капусте 600—1000 л/га. Норма расхода 100—150 г/га. Обработку проводят в вечерние часы наземными или авиационными опрыскивателями.

Вирин-ЭНШ — на основе вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда. Препарат представляет собой суспензию серовато-коричневого цвета, состоящую из полиэдров (тел-включений, содержащих вирус)

в 50%-ном глицерине. В 1 мл препарата должно содержаться не менее 1 млрд. полиэдров. Препарат предназначен для борьбы с личинками I—IV возраста непарного шелкопряда и ивовой волнянки в садах, парках и лесах. Гибель насекомых наступает через 6—12 сут после поедания гусеницами обработанного корма. Вирин-ЭНШ безвреден для человека и животных, а также пчел и других полезных насекомых. Срок хранения при температуре от 0 до +25°С 1 год с момента изготовления.

Препаратом обрабатывают (обычно ручными или ранцевыми опрыскивателями) яйцекладки или деревья, поражаемые вредителем,—3—5 тыс. яйцекладок с интервалами между очагами до 1,5 км. При авиационном способе опрыскивание деревьев с распутившейся листвою производится в период питания гусениц непарного шелкопряда II—III возраста. Минимальный расход препарата 100 мл/га. Рабочая жидкость готовится разбавлением в воде вирина-ЭНШ из расчета 100 мл на 100 л воды. Концентрация должна равняться 1 млн. полиэдров/мл. Перед опрыскиванием в рабочую суспензию добавляют 0,04% растекателя ОП-7. Обработку проводят ленточным способом, желательно в вечерние часы.

Вирина-ДИПОН. Для его изготовления используют штамм вируса *Bacillovirus dipionis* (sin. *Birdia dipionis*).

Препарат вирина-ДИПОН представляет собой суспензию сероватого цвета, содержащую 2% полиэдров, 50% глицерина и 48% воды. Концентрация полиэдров (титр препарата) не менее 1 млрд./мл.

Вирина-ДИПОН применяется против рыжего соснового пилильщика. Гибель гусениц вредителя наступает через 6—12 сут с момента поедания корма и достигает 92—98%. Препарат безвреден для человека, животных и полезных насекомых. Опрыскивание деревьев производят рабочим раствором из любых систем опрыскивателей наземным или авиационным способом. Рабочую суспензию готовят разбавлением 100 мл препарата в 100 л воды. Норма расхода 100 мл/га.

Вирина-АББ. Для получения препарата используют вирусы ядерного полиэдроза и цитоплазматического гранулеза с добавлением лактозы и глицерина. Вирина-АББ — суспензия с осадком темно-коричневого или ко-

ричного цвета, состоящая из 3% полиэдров и гранул, 50% глицерина, 37% воды и 10% лактозы. Титр препарата — не менее 1 млрд. полиэдров и 2 млрд. гранул в 1 мл. Срок хранения препарата 1 год с момента изготовления при температуре не выше $+15^{\circ}\text{C}$ и не ниже 0°C .

Вирин-АББ предназначен для борьбы с гусеницами американской белой бабочки в садах, парках и городских насаждениях. Безвреден для человека, животных и полезных насекомых. Обработку деревьев производят рабочей суспензией опрыскивателями любых систем. Препарат растворяют в воде из расчета 100 мл/г 100 л воды. Минимальная доза препарата 100 мл/г. Все инсектициды, используемые для биологической борьбы с насекомыми и грызунами — вредителями, подвергаются перед их применением обязательной проверке (контролю) на жизнеспособность и микробиологическую активность по ЛД₅₀.

В связи с некоторыми сложностями определения биологической активности препаратов на лабораторных животных проводят определение титра по лабораторным биологическим объектам.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Бактериальные препараты в заводской упаковке (энтобактерин, дендробактерин, ЭКС и др.), технические или аналитические весы, шпатели для взятия 0,01 г, часовые стекла и шпатели для плоскостонная весы, микронизмельчитель или растворитель, пар и с магнитной мешалкой, 0,5%-ный раствор в дистиллированной воде, стеклянные чашки Петри, стерильные пипетки на 1—2 мл, стерильные питательные среды, стерильный и охлажденный до $45-50^{\circ}\text{C}$ питательный раствор, 25—30 мл, 10 пробирок со стерильным стеклом, камера Горяева, покровные стекла, бумага, с осветителем, фильтровальная бумага.

Задание. 1. Изучить микробиологическую технику приготовления бактериальных препаратов, используемых для борьбы с вредными видами животных. 2. Ознакомить с биологией химических инсектицидов.

3. Определить титр энтобактерина.

4. Определить титр вирина-ЭКС.

Методические указания. Для определения титра энтобактерина и других бактериальных препаратов, применяемых для борьбы с насекомыми-вредителями, готовят ряд последовательных разведений препарата в стерильном 0,5%-ном растворе медицинской желчи или в физиологическом растворе. 1 г препарата взвешивают с точностью до 0,01 г, помещают в колбу микроизмельчителя или в плоскодонную колбу, которую ставят на магнитную мешалку. В колбу предварительно наливают 50 мл стерильного 0,5%-ного раствора медицинской желчи. Содержимое колбы хорошо перемешивают в течение 3—5 мин. Колбу доливают раствором желчи до 100 мл и дополнительно перемешивают 2—3 мин (можно стеклянной палочкой). Отстаивают содержимое колбы 1—2 мин. Градуированной пипеткой берут из колбы 1 мл суспензии и вносят в пробирку с 9 мл раствора желчи или физиологического раствора. Новой пипеткой перемешивают содержимое пробирки и переносят 1 мл во 2-ю пробирку, из 2-й в 3-ю и т. д., т. е. делают ряд последовательных разведений препарата до 1:10⁻¹⁰. Из 3-й и 9-й пробирок новыми пипетками берут материал и переносят в 3—5 чашек Петри по 1 мл из каждого разведения (10⁻⁸—10⁻⁶). Чашки заливают стерильным, расплавленным и охлажденным до 45—50°С питательным агаром. Суспензию с агаром тщательно перемешивают путем круговых движений чашки на гладкой поверхности стола. Чашки оставляют на столе до застывания агара, а затем переносят в термостат, где выдерживают в течение суток при температуре 28—30°С. Титр препарата определяют по количеству выросших через 24 ч колоний. Титр препарата (x) в миллиардах жизнеспособных спор/г вычисляют для каждого из исследуемых разведений по формуле

$$x = \frac{n}{s} \cdot P,$$

где n — число колоний (в 3—5 чашках); s — количество чашек; P — степень разведения.

За конечный результат принимают произведение от среднего арифметического двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 30% относительных.

Для определения титра вирусных препаратов определяют количество полиэдров в камере Горяева. Для этого готовят ряд последовательных разведений препарата вирин-ЭКС и помещают в пробирку с 9 мл стерильной дистиллированной воды. Новой пипеткой после перемешивания переносят 1 мл суспензии из 1-й пробирки во 2-ю и т. д. до 1:5⁻¹⁰. Для подсчета полиэдров используют суспензию третьего — пятого разведений (10⁻³—10⁻⁵).

К хорошо обезжиренной камере Горяева осторожно притирают шлифованное покровное стекло до появления по краям фиолетовых колец. Микропипеткой берут суспензию из 3—5 разведения и подслаивают каплю под покровное стекло камеры. Камеру помещают под микроскоп, под малым увеличением находят сетку и подсчитывают количество полиэдров в пяти больших квадратах (их всего 16), далеко лежащих один от другого (четыре угловых и один в середине). При вычислении определяют среднюю делением всех сосчитанных полиэдров на количество их вместивших квадратов. Средняя показывает количество полиэдров в 1/400 мм³ разведенной суспензии (в одном большом квадрате). Умножив полученную среднюю на 4000 и на степень разведения (1000 или 100 000), получают определяемую величину, выражающую содержание полиэдров в 1 мл суспензии препарата. Титр препарата (x) в миллиардах полиэдров в 1 мл вычисляют для каждого из исследуемых разведений по формуле

$$x = \frac{A \cdot 4000 \cdot P}{5},$$

где A — количество полиэдров, подсчитанных в 5 больших квадратах; 4000 — полный объем камеры; P — разведение; 5 — количество больших квадратов. За конечный результат принимают произведение от среднего арифметического двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 30% относительных.

Глава IX

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Изучение микронаселения почв

В местах естественного обитания микроорганизмы развиваются не беспорядочно, а в определенных взаимоотношениях друг с другом. Для каждого местообитания характерны определенный качественный состав и определенное пространственное расположение микроорганизмов, составляющих микробный ценоз, или пейзаж различных почв. При использовании общепринятых методов микробиологических исследований нарушается пространственное распределение микроорганизмов и тем самым нет возможности выявить микробные пейзажи различных горизонтов почв.

Для изучения микронаселения почв, выявления микробных пейзажей, установления направленности и интенсивности процессов, обусловленных жизнедеятельностью микробных биоценозов, определения взаимоотношений, складывающихся в этих биоценозах между отдельными представителями почвенного микромира, предложен ряд методов.

«Стекла обрастания» (по Н. Г. Холодному). В почве делают небольшой разрез. Одну из стенок разреза делают по возможности ровной, стараясь сохранить естественное сложение почвы. Чистое, стерильное, хорошо обезжиренное предметное стекло плотно прикладывают к стенке разреза и прикапывают извлеченной почвой. Местонахождение стекла отмечают сверху колышком.

При достаточной влажности почвы предметное стекло вскоре покрывается почвенным раствором, к его поверхности прилипают коллоидные частички органического и неорганического происхождения. Вместе с почвенным раствором на стекло попадают различные микроорганизмы, которые начинают размножаться и со временем образуют микробиоценозы, характерные для данной почвы и в данное время.

Через 3—4 недели стекло откапывают и осторожно

отделяют от стенки, к которой оно было прижато. Стекло подсушивают на воздухе и фиксируют на пламени горелки. Если на стекле имеются крупные частицы почвы, то после фиксации препарата их осторожно отмывают водой. После фиксации (и промывки) препарат окрашивают фуксином, эритрозином или другими красками, высушивают и микроскопируют. Метод позволяет увидеть под микроскопом состав и распределение микроорганизмов в их природной ассоциации.

Метод капиллярных педоскопов (по Б. В. Перфильеву и Д. Р. Габе). В естественных условиях развитие микроорганизмов происходит в основном на стенках почвенных капилляров. Исходя из этого, Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе сконструировали специальный капиллярный прибор — педоскоп. Педоскоп состоит из пяти плоскопараллельных капиллярных ячеек с очень тонкими стенками. Длина ячеек 1 — 2 см, а ширина около 4 мм. Ячейки крепятся по 5—7 шт. в стеклянной обойме, или держателе. Капиллярные ячейки в разных вариантах педоскопа расположены таким образом, что их каналцы ориентированы или перпендикулярно, или параллельно длинной стороне держателя. Для установки педоскопа в почву вначале делают в ней щель специальным стальным пробойником. Стерильные педоскопы вставляют в почву так, чтобы каналы ячеек приняли вертикальное или наклонное положение, т. е. соответствовали бы преобладающему направлению движения почвенного раствора.

Через 2—3 недели (иногда через 7—8 недель) педоскопы вынимают из почвы и просматривают под микроскопом сначала в неокрашенном виде для обнаружения микрофауны и подвижных бактерий. Педоскопы лучше помещать на специальный столик с устройством, предохраняющим содержимое капилляров от высыхания. После просмотра живых микроорганизмов педоскоп подсушивают, фиксируют и окрашивают. Для этого берут пинцетом ячейку и одним концом погружают в раствор краски. Благодаря капиллярным силам краска заполняет канал ячейки. Через 3—5 мин краситель оттягивают от капилляров фильтровальной бумагой или ватой, а ячейки промывают, погружая их несколько раз в стакан с водой. Избыток воды удаляют из капилляров фильтровальной бумагой, ячейки подсушивают и заполняют капилляры иммерсионным маслом. Подготов-

ленные таким образом препараты просматривают с иммерсионным объективом. В отдельных участках капилляра ячейки будут хорошо видны «микробные пейзажи», соответствующие местам их микроразнонального развития.

Определение нитрификационной способности почвы. Существует ряд методов, позволяющих определить суммарный эффект деятельности микрофлоры почвы по химическим показателям. К таким методам относится определение нитрификационной способности почвы, которая показывает энергию нитратонакопления в почве под действием микроорганизмов.

Для определения нитрификационной способности пользуются методом компостирования почвы при оптимальной температуре и влажности. Энергию нитратонакопления обычно определяют в трех вариантах:

- 1) контроль — компостирование образца увлажненной почвы;
- 2) опыт с внесением сернокислого аммония;
- 3) опыт с внесением люпиновой муки.

Сернокислый аммоний и люпиновую муку добавляют из расчета 30 мг азота на 100 г абсолютно сухой почвы. Это количество азота содержится в 0,14 г сернокислого аммония и примерно в 0,6 г люпиновой муки. Люпиновую муку можно заменить гороховой, соевой и другой мукой, содержащей большое количество белка. Муку смешивают с почвой, а сернокислый аммоний лучше предварительно растворить в воде.

Опыт удобно проводить в глубоких чашках Петри. Берут навеску почвы не более 50 г и добавляют к ней необходимое количество сернокислого аммония и муки. Почву увлажняют до 60% от полной влагоемкости и хорошо перемешивают. Расчет количества воды, которое необходимо добавить в почву для доведения ее влажности до 60% от полной влагоемкости, производят следующим образом. Вначале определяют влагоемкость исследуемого образца по расчету на абсолютно сухую почву. Для этого почву высушивают до постоянной массы при 105° С. Допустим, что влагоемкость почвы равна 50%. Тогда 60% ее составит:

$$\frac{50 \times 60}{100} = 30.$$

Следовательно, к 100 г абсолютно сухой почвы надо было бы добавить 30 мл воды. Но так как почва для

компостирования берется обычно влажная, то иная до добавлять меньше. Так, если исследуемая почва имела 50% от полной влагоемкости и 20% влажности, то для доведения ее до 60% от полной влагоемкости необходимо добавить 30—20, т. е. 10 мл воды. В конце всего опыта влажность почвы подсушивают до одного уровня. Опыт длится 15—20 сут или больше.

Через 2—3 недели нитраты извлекают из почвы водой. Для этого почву переносят в колбу и заливают 5-кратным объемом воды с учетом воды, уже находящейся в почве. Смесь взбалтывают на качалке в течение 3—5 мин, а затем фильтруют через плотный складчатый фильтр. Если фильтрат окажется мутным, то его снова фильтруют через тот же фильтр с почвой до получения совершенно прозрачной жидкости. Для просветления к фильтрату можно добавлять 1,5—2 г активированного угля.

Из полученного фильтрата берут 25 мл, переносят в фарфоровую чашечку и выпаривают досуха на водяной бане. Одновременно выпаривают 10, 25 и 50 мл образцового раствора. После выпаривания в чашки с испытуемым и образцовым растворами прибавляют по 1 мл дисульфифеноловой кислоты. Через 10 мин содержимое чашек размешивают стеклянными палочками. В чашки добавляют по 10 мл воды и по каплям, при постоянном помешивании, 10%-ный раствор аммиака. КОН или NaOH—до посинения красной лакмусовой бумажки. Если в растворе есть нитраты, они окрашиваются в желтый цвет.

Полученные окрашенные растворы переносят в мерные колбы емкостью 100 или 50 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Образцы колориметрируют против того образцового раствора, который ближе по окраске. Количество нитратов выражают в мг NO_3 на 100 г сухой почвы, вычисляя по формуле

$$\frac{a \cdot b \cdot h \cdot d \cdot 100}{h_1 \cdot b_1 \cdot c},$$

где a —титр образцового раствора (содержание NO_3 в 1 мл в мг); b —количество образцового раствора, взятого для выпаривания в мл; h —показатель образцового раствора в колориметре; d —разведение испытуемой вытяжки; h_1 —показатель испытуемого раствора в колориметре; b_1 —разведение образцового раство-

вора; c — количество граммов абсолютно сухой почвы, отвечающее объему испытуемого раствора, взятого для анализа; 100 — коэффициент для пересчета на 100 г почвы.

Для перевода NO_3 в N вводится в числитель коэффициент 0,226. Количество накопленных нитратов в почве определяется по разности содержания их до и после компостирования.

Реактивы:

1. Дисульфифеноловая кислота — 3 г чистого фенола смешивают с 37 г (20,1 мл) концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) и прогревают 6 ч в кипящей водяной бане. Колбу, в которой производится реакция, закрывают притертой пробкой с обратным холодильником.

2. Образцовый раствор нитрата — 0,1631 г химически чистого сухого KNO_3 растворяют в 1 л дистиллированной воды. Берут 100 мл этого раствора и доводят его объем до 1 л. В 1 мл этого рабочего раствора содержится 0,01 мг NO_3 или 0,00225 мг азота.

3. 10%-ный аммиак; водный раствор аммиака с плотностью 0,9 разбавляют 1:1 водой.

4. 20%-ный КОН или NaOH.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Микроскоп, набор красок, ножи для разреза почвы, стерильные предметные стекла, стерильные педоскопы, пробойники для педоскопа, стаканчики для краски и воды, фильтровальная бумага, образцы почвы для компостирования (по 50 г), навески сернокислого аммония и люпиновой муки, пустые чашки Петри, пипетки, вода в колбах по 100 мл, пластмассовые шпатели, фарфоровые стаканчики, водяная баня, дисульфифеноловая кислота, образцовый раствор нитрата, 10%-ный раствор аммиака, 20%-ный раствор КОН.

Задание. 1. Определить микробиоценоз почв методом обрастания стекол по Холодному.

2. Определить микробные пейзажи почвы с помощью педоскопов.

3. Определить нитрификационную способность почвы.

Методические указания. Для проведения опыта по определению микробиоценозов делают разрез почвы по горизонтам (например, 0; 20 и 30 см). Одну стенку разреза делают отвесной. Стерильным пинцетом вынимают из оберточной бумаги стерильное предметное

стекло и плотно прижимают его к отвесной стенке разреза. Место разреза присыпают извлеченной почвой. Над стеклом устанавливают колышек с указанием глубины закладки стекла и даты постановки опыта. Через 2—3 недели осторожно откапывают и вынимают стекла из разреза, подписывают, подсушивают на воздухе и переносят в лабораторию. В лаборатории препараты фиксируют на пламени, окрашивают и микроскопируют под иммерсией.

Для изучения микронаселения почв методом педоскопов последние устанавливают с помощью специальных пробойников в нужные горизонты почвы. Через 1—2 или несколько недель педоскопы вынимают из почвы и просматривают под микроскопом сначала в неокрашенном виде для изучения микрофауны и подвижных бактерий, а затем фиксируют и окрашивают, как описано выше.

Для определения нитрификационной способности почвы ее компостируют. Для этого 50 г почвы помещают в чашку Петри и хорошо перемешивают с раствором сернистого аммония или с люпиновой мукой, увлажняют почву до 60% от полной влагоемкости. Чашки помещают в термостат при температуре 25—27° С.

По истечении срока компостирования (2—3 недели) извлекают нитраты из почвы водой и определяют их количество коллометрическим методом по Гранвальд-Ляжу, как описано выше.

Определение доступных запасов калия и фосфора в почве микробиологическими методами

В почве имеются микроорганизмы, которые используют для своего питания только водно-растворимые формы фосфора и калия, т. е. такие формы, которые усваиваются растениями. Способность этих микроорганизмов увеличивать или замедлять свой рост в зависимости от количества доступных форм калия, фосфора, кальция и других элементов лежит в основе микробиологических методов определения их доступных запасов в почве.

Для определения мобилизуемых запасов фосфорной кислоты и калия в почве и установления ее потребности в соответствующих удобрениях пользуются посевом спор или мицелиальной взвеси грибка *Aspergillus niger*

или *Asp. oryzae* на специальные среды с почвой. Состав сред подобран таким образом, что в них нет либо калия, либо фосфора в зависимости от цели исследования. Источником этих элементов в средах является исследуемая почва. По биомассе грибка, выращенного на среде в течение определенного времени, судят о наличии доступных соединений калия и фосфора в почве.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Колбы с питательными средами для выявления запасов фосфорной кислоты и калия, почва, культура гриба *Aspergillus niger*, бактериологическая петля, посевы предыдущего занятия, реактивы, краски, стекла, микроскоп.

Задание. 1. Изучить морфологию грибка *Asp. niger* в раздавленной капле.

2. Поставить накопительные культуры для определения мобилизуемых запасов калия и фосфора в почве.

Методические указания. Хорошие результаты при определении доступных запасов калия и фосфора в почве можно получить с помощью культивирования грибка *Asp. niger* на минеральной среде следующего состава (в %):

Дистиллированная вода	100,0
Сахароза	10,0
Аммоний сернокислый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6
Магний сернокислый MgSO_4	0,03
Цинк сернокислый ZnSO_4	следы
Медь сернокислая CuSO_4	»
Железо сернокислое FeSO_4	»
Пептон :	0,1
Лимонная кислота	1,0

Эта среда является основой. К ней добавляют соли, содержащие калий или фосфор в зависимости от того, какую цель преследует опыт. Если определяются запасы калия, то к питательной основе добавляют 0,12% фосфорнокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$. При определении запасов фосфора вносят 0,05% K_2SO_4 .

В связи с высоким содержанием в среде лимонной кислоты возможность развития бактерий в ней полностью исключается. Среду можно не стерилизовать.

В конические колбочки емкостью 75—100 мл наливают по 30 мл подготовленной среды и вносят сухую, просеянную через сито исследуемую почву в количестве 3 г в случае определения запасов калия и 5 г при определении фосфора. Параллельно готовят не менее четырех колб.

Подготовленную питательную смесь с почвой заражают чистой культурой гриба *Asp. niger*. Колбы после заражения среды помещают в термостат с температурой 30°С на 5—6 сут. По окончании опыта содержимое колб прогревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин для уничтожения спор гриба и безопасности дальнейшей работы с ним.

Выросший мицелий гриба (пленки) извлекают из колб в чистую чашку Петри или на воронку и хорошо отмывают дистиллированной водой от приставших почвенных частиц и питательной среды. Отмытый мицелий помещают на фильтровальную бумагу и высушивают в течение 12—16 ч при 60°, а затем 2 ч — при 85° и, наконец, при 105°С до постоянной массы. Так как развитие гриба зависит от содержания в среде P_2O_5 и K_2O , то по биомассе высушенного мицелия судят о содержании в исследуемой почве этих элементов и потребности ее в соответствующих удобрениях.

Для большей достоверности учет выросшего мицелия проводят не менее чем в четырех колбах.

При расчете пользуются следующими данными. Если масса мицелия весит 1,3—2,0 г, то почва нуждается в калийном удобрении. При массе мицелия более 2,0 г калийные удобрения можно не вносить. Таким же образом можно установить потребность почвы и в фосфоре. Если масса мицелия весит 100—150 мг, то в почву необходимо вносить фосфорные удобрения. При массе мицелия более 150 мг фосфорные удобрения можно не вносить.

Глава X

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ

Методы выявления ризосферных микроорганизмов

Произрастая на почве, растения вступают в тесные взаимоотношения с содержащейся в ней микрофлорой. В участке почвы, прилегающей к корням растений, микроорганизмов в несколько раз больше, чем в почве, находящейся на некотором расстоянии от корней. Корни как бы окружены микрофлорой. Эта зона почвы, обогащенная микроорганизмами, называется ризосферой. Микроорганизмы ризосферы обеспечивают минерализацию органических веществ и мобилизацию веществ гумуса непосредственно в зоне поглощения питательных веществ корневой системой растений. Кроме того, они выделяют в эту зону большое количество гетероауксинов, гиббереллиноподобных соединений, витаминов, аминокислот, ферментов и других факторов роста. Эти стимуляторы роста усиливают ферментативные процессы в растениях, способствуют усилению корневого питания и более энергичному обмену веществ растений.

В состав микрофлоры ризосферы у некоторых видов травянистых и древесных растений входят грибы. Они образуют вокруг корня чехол из гиф, называемый микоризой. Микориза принимает активнейшее участие в обеспечении растений аминокислотами, минеральными веществами и водой. Они поглощают и утилизируют продукты экзосмоса корней, перерабатывают вещества, угнетающие развитие растений. Взаимосвязь между ризосферными микроорганизмами, микоризой и растениями бывает настолько большой и специфической, что без них растения не могут нормально развиваться.

Установлено, что микрофлора корней резко отличается от микрофлоры почвы как по количественному, так и по качественному составу. Замечены также различия в видовом составе микрофлоры корней различных

сельскохозяйственных растений. Это обусловлено, по-видимому, различным составом корневых выделений растений.

В настоящее время различают: а) собственно корневую микрофлору — находится на поверхности корней или проникает в ткани корня растений; б) прикорневую микрофлору почвы, примыкающую непосредственно к корням (до 0,5 см); в) микрофлору ризосферы, т. е. микрофлору почвенных слоев, расположенных на расстоянии 1 см от корней.

Предложено много методов выявления и выделения ризосферных микроорганизмов (методы Н. А. Красильникова, Е. Ф. Березовой и др.). Хорошие результаты по выявлению ризосферных микроорганизмов в лабораторных условиях дает метод последовательного отмывания корней, предложенный Е. С. Теппер.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Корни растений, 5 колб с 99 мл стерильной дистиллированной воды, 2 колбы с 99 мл воды и песком (10 г), фарфоровые ступки, ножницы, пипетки, градуированные на 1 мл, чашки с МПА, шпатель, бактериологическая петля, стекла, краски, микроскоп.

Задание. 1. Произвести последовательное отмывание корней растений по Е. С. Теппер в 7 колбах.

2. Произвести посев на 2 чашки с МПА из 6-го и 7-го смыва корней.

3. Приготовить мазок из смыва, окрасить его по Граму, изучить морфологию ризосферных микроорганизмов.

4. Прокипятить колбы с ростом гриба *Aspergillus niger*, извлечь и отмыть мицелий, поместить его в шкаф для высушивания.

Методические указания. В полевых условиях выкапывают лопатой интересные растения вместе с почвой и корнями. В лабораторных условиях растения извлекают из сосуда после сильного увлажнения в нем почвы. Приставшая к корням почва отмывается путем многократного погружения растений в сосуд с водопроводной водой или удаляется пинцетом. Избыток воды с корней удаляют фильтровальной бумагой. На стерильном часовом стекле отвешивается 1 г молодых живых корней. Стерильным пинцетом помещают навеску корешков в коническую колбу, содержащую 99 мл сте-

рильной дистиллированной или водопроводной воды. Колбу встряхивают в течение 2 мин. Отмытые корешки осторожно переносят металлической петлей во вторую такую же колбу со стерильной водопроводной водой и колбу встряхивают 2 мин, после чего отмытые корешки переносят в третью колбу со стерильной водой, из третьей в четвертую и т. д., до седьмой колбы. Шестое и седьмое отмывание проводят в колбах, содержащих стерильную дистиллированную воду и 10 г хорошо отмытого стерильного кварцевого песка. Из каждой колбы делается посев по 0,05 мл жидкости на 3 чашки Петри с мясо-пептонным агаром или другой плотной питательной средой. Каплю жидкости хорошо втирают шпателем в поверхность агара над пламенем. Чашки после посева помещают в термостат с температурой 30° С. Через 5—6 сут проводится подсчет общего количества колоний, выросших в каждой чашке, и учет микробов по физиологическим группам (споровые, беспоровые, кокки и т. д.). Общее количество бактерий принимается за 100%, а отдельные группы микроорганизмов выражаются в процентах от общего количества колоний, выросших в чашке. Казалось бы, что чем больший номер колбы, в которой отмывались корешки, тем больше будет разведение и тем меньше в них содержится микроорганизмов.

На самом деле количество выросших колоний в чашках с увеличением отмывания уменьшается незначительно. Более того, в двух последних колбах, где отмывание корешков проводилось с песком, количество выросших колоний может быть гораздо большим, чем в первых отмываниях. Это объясняется тем, что песком отделяются микроорганизмы, расположенные непосредственно на корне и находящиеся в тесном контакте с ним. В этих колбах преобладают беспоровые палочковидные бактерии в отличие от первых колб, где преобладают обычно спорозонные формы бактерий.

Для количественного учета микроорганизмов ризосферы умножают число выросших в чашке колоний на разведение (отмывку) и пересчитывают на массу корней, взятых для анализа. В результате получается количество бактерий, приходящихся на 1 г корней. Количество ризосферных бактерий, содержащихся на корнях, зависит от вида и стадии вегетации растений. Наибольшее количество их приходится на период цветения.

Для полного количественного учета ризосферных бактерий растирают навеску корней с кварцевым песком в ступке, готовят ряд последовательных разведений из растертой массы и из каждого разведения делают посев на соответствующие питательные среды.

Эпифитная микрофлора растений

Некоторые бактерии и грибы, обитающие в почве и на корнях, постепенно переходят на наземную часть развивающегося растения и расселяются на ней. Эта микрофлора, развивающаяся на наземных частях растений, получила название эпифитной.

При жизни растения эпифитная микрофлора не оказывает на него вредного влияния. Наоборот, питаясь продуктами экзосмоса растений, она способствует освобождению тканей от продуктов собственного обмена. После уборки растений эти микроорганизмы составляют основную массу микрофлоры растительной продукции — зерна, овощей, сена и др.

При нормальных условиях уборки и хранения состав эпифитной микрофлоры довольно типичен и постоянен. Наиболее часто в составе эпифитной микрофлоры встречаются бактерии из группы *Pseudomonas* — до 90% (*Ps. herbicola* — до 60% и *Ps. fluorescens* — до 30%), споровые бактерии различных видов — до 2%, группа *Coli aerogenes* — до 2% и около 10% составляют молочнокислые бактерии. В незначительном количестве в кормах есть споры плесневых грибов и дрожжи.

Помимо указанных микроорганизмов в составе микрофлоры, семян и кормов могут встречаться фитопатогенные и патогенные, или токсичные для животных виды бактерий или грибов. Они попадают на растения с пылью или капельками влаги из воздуха, с частичками почвы, с испражнениями людей и животных или переносятся насекомыми. Патогенные для животных бактерии на растениях не размножаются, а находятся в анабиотическом состоянии. Попадая с кормом в организм животного, они могут вызывать у них инфекционные заболевания. Многие виды сапрофитных бактерий и грибов, попадая в корма, обуславливают токсичность последних для животных.

При неблагоприятных условиях хранения кормов резко изменяется численность микроорганизмов и про-

центное соотношение между различными видами микробов: уменьшается количество бактерий из группы *Pseudomonas* и резко возрастает число споровых форм бактерий и грибов. Поэтому видовой состав микроорганизмов может быть использован как показатель качества хранения зерна и кормов. Несмотря на это, микробиологическое исследование кормов проводят чаще всего в тех случаях, когда имеется подозрение на присутствие в них патогенных микроорганизмов или их токсинов. Исследуют и грубые (сено, солома, силос), и концентрированные корма (зерно, комбикорм и др.).

Для фитопатологического анализа семян и микробиологического исследования кормов отбирают среднюю пробу в количестве: зерно — 1 кг, сено — 0,5 кг, силос — 1 кг. Отобранные образцы упаковывают в стерильную бумагу, в мешочки из синтетической ткани или в стеклянные банки с плотно закрывающимися пробками.

При поступлении проб в лабораторию производят органолептический анализ (цвет, запах, наличие заплесневения и грибов-паразитов); микроскопическое исследование соскобов или смывов для обнаружения спор и мицелия грибов; первичные посевы с целью выделения чистых культур бактерий и грибов и определения общей зараженности образцов микроорганизмами.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Чашки Петри с агаром Чапека, с мясо-пептонным агаром и с сусло-агаром (в зависимости от цели и материала, взятого для исследования), колба с 90 мл стерильной воды, пробирки с 9 мл стерильной воды (для разведений), навески зерна или кормов, пипетки градуированные, шпатели, пипетки пастеровские, марля или стеклянные фильтры, пинцеты.

Задание. 1. Определить общую бактериальную зараженность зерна методом смыва.

2. Произвести посев зерна на агар Чапека методом раскладки для выявления грибов.

Методические указания. Учет эпифитной микрофлоры растений производят методом смыва или раскладки.

Метод смыва. 10 г цельного зерна, нарезанной соломы или сена (до 2 см длины) переносят стерильным пинцетом в колбу с 90 мл стерильной воды. В колбу перед стерилизацией можно добавить хорошо отмытый песок. Колбу с содержимым встряхивают 10 мин на

качалке, а затем отстаивают в течение 1—2 мин. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через 3—4 слоя стерильной марли в стерильную колбу. Стерильной пипеткой переносят 1 мл фильтрата в пробирку с 9 мл стерильной воды. После хорошего перемешивания жидкости в пробирке из нее новой пипеткой переносят 1 мл во 2-ю пробирку с тем же количеством стерильной воды. Содержимое пробирки перемешивают, и 1 мл переносят в 3-ю, из 3-й в 4-ю и т. д. пробирки, достигая разведения 1:1 000 000.

Из трех последних разведений делается высев на МПА для выделения аэробных бактерий, на сусло-агар с мелом для выявления молочнокислых бактерий, на картофельную среду с мелом — для маслянокислых бактерий и на агар Чапека — для выделения грибов. На поверхность среды в чашке Петри стерильной пипеткой наносится 0,1 мл соответствующего разведения и втирается стерильным шпателем в поверхность агара. Исследуемую жидкость можно вносить в стерильную чашку Петри, а затем заливать расплавленным и охлажденным до 45° С агаром. Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 25—30° С на 48—72 ч. Учет количества бактерий, содержащихся в навеске корма, производится аналогично учету микрофлоры в почве.

Метод раскладки. На МПА или агар Чапека в чашках Петри раскладывают стерильным пинцетом по 100 зерен, по 100 кусочков соломы или сена. Частицы корма раскладывают так, чтобы они не соприкасались друг с другом. На одну чашку обычно укладывают 20—25 зерен злаков или 10—15 кусочков сена, силоса или другого корма. Для выделения микроорганизмов из глубинных слоев зерно дезинфицируют в растворе формалина 1:300 в течение 1 ч; в 70%-ном спирте или растворе сулемы 1:1000 в течение 5 мин.

После дезинфекции зерно 3—4 раза промывают в стерильной воде и раскладывают стерильным пинцетом на поверхность питательной среды.

Культивирование посевов производится при температуре 22—27° С. Чашки просматривают на 3, 5, 7, 10-й дни после посева. Иногда их выдерживают дополнительно 3—5 дни для выявления медленно развивающихся бактерий и грибов. При появлении колоний бактерий и грибов вокруг зерен их выделяют в чистую культуру по общепринятой методике.

Глава XI

ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

Иммунитет — это совокупность защитных механизмов, обеспечивающих сохранение постоянства внутренней среды и функции организма при вторжении и распространении болезнетворных микробов, их токсинов или других чужеродных тел белковой природы.

Еще в древности было известно, что люди, перенесшие ту или иную инфекционную болезнь, в течение определенного времени оказываются невосприимчивыми к повторному заражению теми же бактериями или вирусами. Организм приобретает активную специфическую устойчивость к данной инфекции. Это происходит благодаря появлению в переболевшем организме специфических антител против данного возбудителя заболевания.

Впоследствии было выяснено, что антитела накапливаются в организме и при искусственном введении в организм ослабленных или убитых возбудителей инфекционных заболеваний или продуктов их жизнедеятельности.

Антитела представляют собой белки, принадлежащие к группе γ -глобулинов. По своей химической структуре и свойствам они идентичны «нормальным» γ -глобулинам сыворотки крови. Происхождение антител и механизм их образования — одна из самых трудных проблем в иммунологии. До сих пор не найдено удовлетворительного решения этой проблемы. Считают, что антитела образуются в фагоцитирующих клетках ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), к которым относятся большинство клеток селезенки, лимфатических узлов и костного мозга, клетки эндотелия печени, легких, кожи и других органов.

Специфические антитела образуются и накапливаются в результате раздражения клеток лимфоидной ткани РЭС антигенами, естественно проникшими (при

заболевании) или искусственно введенными (при иммунизации) в организм. Накапливаясь в организме, они защищают его от возбудителя инфекции и ликвидируют болезнетворное начало.

Антигенами называют такие вещества, которые при парентеральном введении (минуя желудочно-кишечный тракт) в организм животного или человека вызывают образование специфических антител. Антигенами могут быть как возбудители инфекционных заболеваний или продукты их жизнедеятельности, так и совершенно безвредные вещества, чаще всего белковой или полисахаридной природы. Вне организма (в пробирке) антитела способны вступать в реакцию специфического взаимодействия с антигенами и вызывать их осаждение — преципитацию, склеивание — агглютинацию, растворение — лизис или нейтрализацию токсинов.

Все реакции антиген — антитело основаны на соединении антигена с гомологичным, специфическим антителом. В качестве источника антител используют сыворотку крови многократно иммунизированных (гипериммунизированных) животных, чаще всего кроликов. Сыворотки крови, содержащие специфические антитела, называются *иммунными*. Способность специфического взаимодействия между антигеном и антителом используется в лабораторной практике для диагностики инфекционных заболеваний людей, животных и растений. Чаще всего для этих целей пользуются постановкой реакции преципитации и реакции агглютинации.

Реакция преципитации заключается в изменении дисперсности коллоидов антигена (растворимого белка) и их осаждении под влиянием специфических антител, находящихся в иммунной сыворотке. Коллоидные частицы, образующиеся в результате взаимодействия антител с соответствующим антигеном, обычно электрически нейтральны и соединяются в крупные конгломераты. В результате этого коллоид становится нестойким и в пробирке появляется видимый невооруженным глазом непрозрачный беловато-матовый осадок.

Реакция исключительно специфична и чувствительна. С ее помощью можно улавливать минимальные количества белка и даже его следы, далеко не всегда определяемые химическими методами. Кроме того, эта реакция позволяет определить природу белка.

Реакция агглютинации. Агглютинацией называется склеивание микробных клеток под влиянием антител — агглютининов, содержащихся в сыворотке крови, и образование хлопьев или комков. Это очень специфическая реакция. В организме животного агглютинация не всегда вызывает гибель микробов. Однако, собирая их группами, облегчает лейкоцитам «охоту» на них. Лейкоцитам и другим фагоцитирующим клеткам во много раз легче захватить склеенные вместе бактерии, чем фагоцитировать их по отдельности. Кроме того, агглютинины, по-видимому, вызывают опсонизацию (подготовку к перевариванию) поверхности бактерий, что облегчает фагоцитоз.

Реакция агглютинации применяется в тех же целях, что и реакция преципитации. По технике постановки различают несколько разновидностей реакции агглютинации: пробирочную, пластинчатую, капельную.

Иммунологические реакции высоко чувствительны и специфичны. Однако специфичность их не абсолютна, так как существуют групповые реакции, зависящие от способности различных, но близких по своему химическому составу антигенов вступать в реакцию с одной и той же иммунной сывороткой.

Все иммунологические реакции протекают только в присутствии электролитов, например 0,85%-ного раствора хлористого натрия. Различают две фазы в течении иммунологических реакций:

1) специфическая фаза — антитело адсорбируется на поверхности антигена. Эта фаза протекает при повышенной температуре, но остается невидимой, так как внешнего эффекта не дает; 2) неспецифическая фаза — протекает аналогично коллоидным процессам: происходит растворение, склеивание или осаждение антигена. Протекает она медленно и лучше всего выявляется через 12—18 ч при температуре 4—6° С. В зависимости от внешнего проявления процесса взаимодействия антител с антигеном можно увидеть невооруженным глазом осаждение антигена, выпадение его в осадок или лизис клеток.

Иммунологические реакции применяют в двух целях:

а) для выявления антител в сыворотке больного при помощи реакции с заведомо известным антигеном (диагностикум);

б) для обнаружения в исследуемом материале специфического антигена при помощи реакции с заведомо известной иммунной сывороткой.

Вследствие более простой организации у растений (по сравнению с животными) процессы развития инфекции и механизм устойчивости (иммунитета) у них проще, чем у животных и человека. Врачи обычно говорят о врожденном и приобретенном (в результате перенесенного заболевания или вакцинации) иммунитете. Напряженность приобретенного иммунитета обычно очень высокая и обусловлена накоплением антител.

Совершенно иное положение отмечается в растительном мире. Здесь также имеет место явление естественной (врожденной) невосприимчивости, проявляющейся на довольно высоком уровне. У растений наблюдается также и приобретенная невосприимчивость к возбудителям инфекций. Но случаи приобретенного иммунитета у растений более редки, чем у животных, а главное — приобретенная невосприимчивость у растений ничего общего не имеет с иммунитетом животных, она проявляется лишь в течение короткого срока и только на участках, близко соприкасающихся с местом иммунизации. Поэтому для защиты растений от болезней практическое значение имеет не искусственно приобретенный иммунитет, а присущий растительным тканям врожденный естественный иммунитет. Он вырабатывается в ходе длительной эволюции или же создается в результате селекции.

Естественный иммунитет растений основан на способности живой клетки синтезировать в ответ на инфекцию защитные вещества. Эти вещества называют по-разному: фитоалексинами, фитонцидами, антибиотическими или фунгитоксическими соединениями. Химическая природа и механизм действия этих веществ еще недостаточно изучены. В отличие от антител, все защитные вещества, которые удалось выделить из растений, оказались небелковой природы. Они принадлежат к сложным циклическим соединениям и не имеют ничего общего с антителами животных.

Все микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы), возбудители болезней растений представляют собой полноценные антигены. При иммунизации ими животных удается получить иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела. В настоящее время получены

сыворотки ко многим грибам, бактериям и особенно вирусам, вызывающим инфекционные заболевания растений. Такие сыворотки широко используются в фитопатологии, селекции и семеноводстве. Они применяются для ранней диагностики грибковых, бактериальных и вирусных заболеваний растений; в целях дифференциальной диагностики возбудителей, вызывающих сходные симптомы заболеваний; для отбора здоровых, устойчивых к заболеванию растений при селекционной работе и для определения устойчивости растений к заболеваниям.

Все эти многочисленные задачи решаются проведением различных серологических реакций между антителами сывороток и антигенами. В качестве антигенов при постановке реакций используют или чистые культуры возбудителей заболеваний, или сок растений, подозреваемых в заболевании, или диализированные белки растительных тканей. В работе с растениями чаще всего применяются реакции преципитации и реакции агглютинации.

ПРОВЕДЕНИЕ ЗАНЯТИЯ

Оборудование и материалы. Свежие листья растений, зараженных вирусом; клубни картофеля, зараженного вирусом Х; соковыжималка или пинцет Пиана; стерильные салфетки, смоченные физиологическим раствором (в чашках Петри), предметные стекла, иммунные и нормальная сыворотки, физиологический раствор в пробирках, преципитационные пробирки, раствор диализованных белков растения, взвесь фитопатогенных бактерий в физиологическом растворе (3 культуры).

Задание. 1. Произвести дифференциацию фитопатогенных бактерий постановкой пластинчатой (капельной) реакции агглютинации на стекле.

2. Поставить капельную реакцию агглютинации с соком, полученным из листьев больного растения или клубня картофеля.

3. Поставить реакцию преципитации из диализированных белков растений.

Методические указания. Для дифференциации фитопатогенных бактерий по реакции агглютинации студентам выдаются разведенные нормальная и иммунная сыворотки, специфичные к одному из возбудителей бактериоза растений. В качестве антигена выдают три

пробирки с взвесью фитопатогенных бактерий в физиологическом растворе. В одной из пробирок находится возбудитель, на который получена иммунная сыворотка. Пробирки с сыворотками и культурами нумеруются.

Техника постановки капельной реакции агглютинации.

На три предметных стекла наносят пастеровской пипеткой по капле иммунной сыворотки. Капли наносят ближе к одному из концов стекла. На второй конец стекла из пастеровской пипетки капают каплю нормальной сыворотки. Стекла с каплями нумеруют. Пастеровской пипеткой набирают взвесь фитопатогенных бактерий из

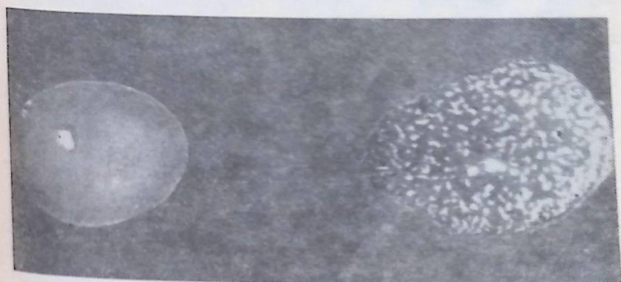


Рис. 88. Реакция агглютинации на стекле

пробирки и капают по 1 капле в нормальную и иммунную сыворотки. Номер вносимой культуры должен соответствовать номеру предметного стекла с сывороткой. Сыворотки и внесенную взвесь бактерий хорошо перемешивают бактериологической петлей или, проще, углом чистого предметного стекла. Наблюдения ведут в течение 5—10 мин.

При совпадении антигена и антитела в капле смеси (сыворотка+антиген) через несколько минут появляются зернышки или хлопья, жидкость в капле просветляется. Следовательно, реакция положительная. Если внесенный антиген не соответствует содержащимся в сыворотке антителам, то капля остается равномерно мутной, как в каплях с нормальной сывороткой (рис. 88).

Для постановки диагноза на вирусное заболевание вегетирующего растения ставят капельную агглютинацию с его соком.

Антиген получают из листьев свежего растения или из клубней проросшего картофеля. Для этого свежие листья свертывают плотным жгутом, а картофель нарезают мелкими кусочками и завертывают в стерильную салфетку из трех слоев марли. Салфетку перед употреблением смачивают стерильным физиологическим раствором и слегка отжимают. Салфетку с листьями или картофелем перекручивают и сдавливают пинцетом Пиана или соковыжималкой. Появившийся сок собирают в пробирку или наносят в виде капли на предметное стекло. К капле сока на предметном стекле добавляют каплю иммунной сыворотки, содержащей антитела к предполагаемому возбудителю болезни. Углом предметного стекла хорошо перемешивают капли. Если в соке растения содержится антиген, соответствующий антителам сыворотки, то в капле появляются хлопья, а жидкость просветляется. В капле с нормальной сывороткой или при отсутствии в растении соответствующего вируса жидкость остается равномерно мутной. Образование видимого осадка при смешивании растительных соков, содержащих вирус с их антисывороткой, обычно классифицируется как реакция преципитации. Однако если капля неочищенного растительного сока, содержащего вирус, смешивается с антисывороткой, то происходит склеивание мелких частиц материала растения-хозяина. Явление это можно наблюдать невооруженным глазом или через микроскоп при малом увеличении. Хотя в этом случае в реакцию не вовлекаются антитела, специфичные к веществам растения, тем не менее указанный процесс называют реакцией агглютинации (по-видимому, из-за внешнего сходства выпадающего осадка) со специфической агглютинацией бактерий под действием противобактериальной антисыворотки.

Реакция преципитации. Для определения устойчивости растений к инфекционному заболеванию селекционерами широко используется серологический метод, предложенный Т. И. Федотовой (1935). По этому методу ставят реакцию пробирочной кольцепреципитации иммунной сыворотки, полученной на определенного возбудителя, с раствором диализата белка исследуемого

растения. Антитела, содержащиеся в иммунной сыворотке, при встрече с белком восприимчивого сорта растения дают положительную реакцию преципитации. Белок сыворотки и белок антигена, соединяясь, образуют видимое невооруженным глазом кольцо преципитата на границе жидкостей (рис. 89). Это означает, что

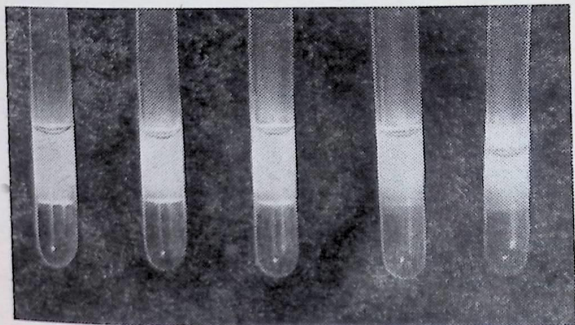


Рис. 89. Реакция кольцепреципитации

белок восприимчивого сорта серологически родствен с антигеном, используемым для иммунизации животного, т. е. с белком возбудителя болезни. Отрицательная реакция указывает на устойчивость сорта — нет серологического родства между белком возбудителя болезни и белком исследуемого сорта растения. Точного объяснения существующего родства между белками растения-хозяина и микроба-паразита нет. Предполагают, однако, что восприимчивые сорта, обеспечивая возбудителя болезни питанием, влияли на состав и строение белков этого паразита. Эта принятая пища оказывает определенное влияние на создаваемые организмом специфические белки, что и улавливается реакцией иммунитета.

Техника постановки реакции кольцепреципитации.

Для постановки реакции преципитации требуется: 1) иммунная сыворотка к предполагаемому возбудителю заболевания; 2) антиген — диализированный белок растения; 3) физиологический раствор; 4) тонкие пасте-

ровские пипетки; 5) преципитационные пробирки диаметром 3—5 мм; 6) штативы к пробиркам.

Сыворотки, антиген и физиологический раствор должны быть совершенно прозрачными.

В узкие преципитационные пробирки, установленные в штативе, наливают пастеровской пипеткой по 0,5 мл преципитирующей сыворотки, разведенной физиологическим раствором 1:2. По стенке наклоненной пробирки осторожно, тонкой пастеровской пипеткой насаивают на сыворотку 0,5 мл белкового диализата растений, разведенного последовательно до нужной концентрации (1:2; 1:4 и т. д.). Пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят в штатив. При хорошем наслоении отчетливо бывает заметна граница соприкосновения сыворотки с антигеном.

При наличии в диализате (восприимчивое растение) специфического преципитиногена, а в сыворотке — антиген к нему, на границе жидкостей появляется дымчатое кольцо (диск) выпавшего преципитата. Кольцо должно возникнуть в специфических случаях в течение 5—10 мин после насаивания жидкостей. Диагностическую оценку ведут на черном фоне в проходящем свете.

При постановке этой реакции для исключения неспецифической преципитации обязательно ставят следующие контроли:

- 1) преципитирующая сыворотка + физиологический раствор;
- 2) нормальная сыворотка + исследуемый антиген;
- 3) преципитирующая сыворотка (заведомо) + специфический антиген.

В двух первых пробирках контроля реакция должна быть отрицательной.

ЛИТЕРАТУРА

- Алешина О. А. Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений. М., 1975.
Аристовская Т. В., Владимирская М. Е., Голлербах М. М. и др. Большой практикум по микробиологии. М., 1962.
Бабьева И. П., Агре Н. С. Практическое руководство по биологии почв. М., 1971.
Березова Е. Ф. Бактериальные удобрения. М. — Л., 1961.
Блукет А. А., Емцев В. Т. Ботаника с основами физиологии растений и микробиологии. М., 1969.

- Гешеле Э. Э. Основы фитопатологической оценки в селекции. М., 1964.
- Доросинский Л. М. Бактериальные удобрения — дополнительное средство повышения урожая. М., 1965.
- Дунин М. С., Шкляр Т. Н. Тезисы докладов III Всесоюзного совещания по иммунитету растений к болезням и вредителям. 1960.
- Зубжицкий Ю. Н. Метод люминесцентной микроскопии. — М.: Медицина, 1964.
- Имшенецкий А. А. Оптимальные питательные среды для сульфурлирующих бактерий. Микробиология, 1966, т. 18, вып. 4.
- IX Международный конгресс по микробиологии: Тезисы докладов. М., 1966.
- Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Микробиология. М., 1970.
- Мишустин Е. Н., Шильников В. К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М., 1968.
- Мэттьюс Г. Серология растительных вирусов: Пер. с англ., М., ИЛ, 1961.
- Пехов А. П. Генетика бактерий. М., 1977.
- Пиз Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии: Пер. с англ. М., ИЛ, 1963.
- Работнова И. Л. Общая микробиология. М., 1965.
- Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии /Под ред. Л. Б. Борисова. М., 1979.
- Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М., 1964.
- Родина А. Г. Методы водной микробиологии. М. — Л., 1965.
- Стейнер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. М., 1979.
- Федоров М. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1957.
- Фробишер М. Основы микробиологии: Пер. с англ., М., 1965.
- Черемисинов Н. А., Боев Л. И., Семихатова О. А. Практикум по микробиологии. М., 1961.
- Чистяков Ф. М., Мудрецова-Висс К. А. Микробиология. М., 1962.

Георгий Иванович Ежов
РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Редактор Ю. А. Елков. Переплет художника Б. А. Школьника. Художественный редактор Т. А. Коленкова. Технический редактор Н. В. Яшукова. Корректор С. К. Завьялова

ИБ № 2945

Изд. № Е-342. Сдано в набор 23.01.81. Подп. в печать 09.10.81. Т-25952. Формат 84×108^{1/32}. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 14,28 усл. печ. л. 14,38 усл.-кр. отт. 14,43 уч.-изд. л. Тираж 10 000 экз. Заказ № 331. Цена 60 коп.

Издательство «Высшая школа»,
Москва, К-51, Неглинная ул., д. 29/14

Типография им. Аюхина Управления по делам издательств, полиграфии и книжной торговли Совета Министров КАССР. 185630. Петрозаводск, ул. «Правды», 4.

