

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО

Медицинский факультет

Кафедра биологии и физиологии человека

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторный практикум

Тирасполь

*Издательство
Приднестровского
Университета*

2024

УДК 579.22(075.8)
ББК Е478я73
Ф50

Составитель:

В.В. Власов, канд. биол. наук, доцент

А.И. Шульман, старший преподаватель

Рецензенты:

В.А. Шептицкий – зав. кафедрой физиологии и санокреатологии
ПГУ им. Т.Г. Шевченко; доктор биол. наук, профессор

К.К. Вдовиченко – доц. кафедры биологии и физиологии человека
ПГУ им. Т.Г. Шевченко; канд. биол. наук

Физиология микроорганизмов: Лабораторный практикум
Ф50 [Электронный ресурс] / ГОУ «Приднестровский государственный
университет им. Т.Г. Шевченко» ; Медицинский факультет ; Кафе-
дра биологии и физиологии человека ; составители: В.В. Власов,
А.И. Шульман. – Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та, 2024. – 56 с.
Минимальные системные требования: CPU (Intel/AMD)
1,5 ГГц/ ОЗУ 2 ГГб/HDD 450 Мб/1024*768/Windows 7 и старше/
Internet Explorer 11/Adobe Acrobat Reader 6 и старше.

*Лабораторный практикум посвящен актуальной проблеме изучения
биохимических свойств микроорганизмов.*

*Лабораторный практикум предназначено для студентов 2 курса специ-
альности 31.05.01 «Лечебное дело», изучающих учебный курс «Микробиоло-
гия и вирусология», но может также представлять интерес для учителей
колледжей, лицеев, гимназий, преподавателей ВУЗов.*

УДК 579.22(075.8)

ББК Е478я73

Рекомендовано Научно-методическим советом ПГУ им. Т.Г. Шевченко

© В.В. Власов, А.И. Шульман, составление, 2024

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторный практикум

Составители:

В.В. Власов, А.И. Шульман

ИЛ № 06150. Сер. АЮ от 21.02.02.

Подписано в печать ..24. Формат 60 × 90/16.

Усл. печ. л. 3,5. Электронное издание. Заказ № .

Изд-во Приднестр. ун-та. 3300, г. Тирасполь, ул. Мира, 18.

Оглавление

Введение	4
<i>Лабораторная работа № 1. Питательные среды. Выделение чистых культур микроорганизмов. Методы стерилизации</i>	5
Часть I. Искусственные питательные среды. Техника посева	5
Часть II. Методы стерилизации	11
<i>Лабораторная работа № 2. Получение чистой культуры бактерий. Культуральные свойства бактерий</i>	15
Часть I. Получение чистой культуры бактерий	15
Часть II. Пигментообразование бактерий	18
<i>Лабораторная работа № 3. Схемы идентификации бактерий</i>	20
<i>Лабораторная работа № 4. Определение потребности бактерий в кислороде. Определение цитохромоксидазы и каталазы у бактерий</i>	27
Часть I. Определение потребности бактерий в кислороде	28
Часть II. Определение цитохромоксидазы	28
Часть III. Обнаружение каталазы у бактерий	31
Часть I. Проведение пробы Хью-Лейфсона (O-F test)	32
Часть II. Определение цитохромоксидазы методом Габи-Хадли	33
Часть III. Обнаружение каталазы у бактерий	34
<i>Лабораторная работа № 5. Обнаружение сахаролитических ферментов бактерий. «Пёстрый ряд»</i>	35
<i>Лабораторная работа № 6. Определение протеолитических и липолитических свойств бактерий</i>	40
Часть I. Протеолитические свойства бактерий	40
Часть II. Липолитические свойства бактерий	43
Часть I. Определение протеолитических свойств	44
Часть II. Определение липолитических свойств бактерий	45
<i>Лабораторная работа № 7. Дополнительные биохимические тесты для идентификации бактерий</i>	47
Использованная литература	55

Введение

Данный практикум составлен согласно учебному плану и рабочей программе по предмету «Микробиология, вирусология» для студентов медицинских специальностей. Выполнение лабораторных работ по данному блоку направлен на усвоение студентам основных методов проведения работ по выделению и идентификации бактерий.

В представленной работе описано проведение лабораторных работ по темам рабочей программы: «Питательные среды», «Методы стерилизации», «Методы выделения бактерий на питательные среды», «Изучение культуральных свойств бактерий», «Биохимические свойства бактерий», «Идентификация бактериальной культуры».

Каждая лабораторная работа начинается с теоретической части, в которой изложены наиболее важные тезисы, позволяющие студенту понять цель и важность проведения данного вида исследования.

Теоретическая часть позволяет закрепить и конкретизировать знания обучающихся о жизненном цикле, росте, размножении прокариот, способах культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, их культуральных и биохимических признаках, специфических аспектах их физиологии. В теоретической части необходимые данные могут быть представлены в виде таблиц и схем, позволяющих быстрее запомнить материал. Затем следует лабораторный протокол, которому студенты следуют непосредственно на лабораторном занятии и пояснения к тому, что должно быть занесено в рабочую тетрадь. Также в лабораторном протоколе даются образцы рисунков и таблиц для заполнения рабочей тетради.

Назначение практической части лабораторной работы - получение студентами навыков выполнения работ с живыми культурами микроорганизмов, проведения микробиологических исследований, таких как посев на питательную среду по методу Дригальского и истощающим штрихом, получения чистой культуры бактерий, проведение биохимических тестов для идентификации выделенного штамма, составление схемы идентификации бактериальной культуры на основе её биохимических свойств.

Данный практикум также может быть использован для углублённого изучения соответствующего раздела в предмете «Общая биология» либо при проведении факультативных занятий.

Лабораторная работа № 1

Питательные среды. Выделение чистых культур микроорганизмов. Методы стерилизации

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Типы питания бактерий. 2. Факторы роста. Ферменты. 3. Механизмы транспорта питательных веществ. Ионный обмен. 4. Методы и средства выделения чистой культуры бактерий.	Рис.: 1. Посев методом Дригальского, 2. Посев методом истощающего штриха Схема: Этапы выделения чистой культуры бактерий	Таблицы: 1. Типы питательных сред 2. Методы и режимы стерилизации

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Искусственные питательные среды. Техника посева

Для изучения и идентификации микроорганизмов используются их чистые культуры. Чистые культуры получают путем посева микроорганизмов и их дальнейшего выращивания (*культивирования*) в лабораторных условиях на искусственных питательных средах.

Питательная среда (*искусственная питательная среда*, ИПС) - это субстрат, на(в) котором будут расти микроорганизмы и который должен содержать все необходимые элементы, обеспечивающие рост и развитие микроорганизма. ИПС могут быть *природного происхождения*, они имеют неопределенный химический состав (например мясопептонный агар, картофельный агар и т.д), или могут быть составлены из точно известных количеств реактивов, их химический состав точно известен, они называются *синтетическими* ИПС.

На питательных средах могут расти не все микроорганизмы. Например, облигатные внутриклеточные паразиты, такие как риккетсии или хламидии настолько сильно зависят от обмена веществ

своего хозяина, что подобрать для них искусственную питательную среду является невыполнимой задачей. Для других бактерий, таких как *Borrelia* (возбудители болезней Лайма и возвратных тифов) питательная среда (она называется BSK-H Medium Base) содержит более 60 компонентов, готовится в несколько этапов и имеет высокую стоимость, поэтому в широкой практике не получили распространения. Вирусы не имеют своего обмена веществ и совершенно не могут развиваться на искусственных средах. Для таких микроорганизмов применяют особые методы идентификации и изучения, например, заражают ими культуры клеток человека или животных, растущих на питательной среде.

По консистенции питательные среды могут быть разными:

Таблица 1-1

Классификация питательных сред по консистенции

Вид среды	Состав	Примеры использования
Плотная	Питательный бульон с добавлением 1,5...2 % агара питательный бульон с желатином (15...20%)	Выделение чистой культуры, получение изолированных колоний, изучение культуральных свойств, накопление чистой культуры, изучение биохимических признаков.
Полужидкая	Питательный бульон с 0,4...0,5 % агара	Изучение биохимических признаков исследуемой бактерии
Жидкая	Питательный бульон, отвары, настои	Накопление биомассы микроорганизмов, изучение биохимических признаков, изучение культурально-морфологических свойств

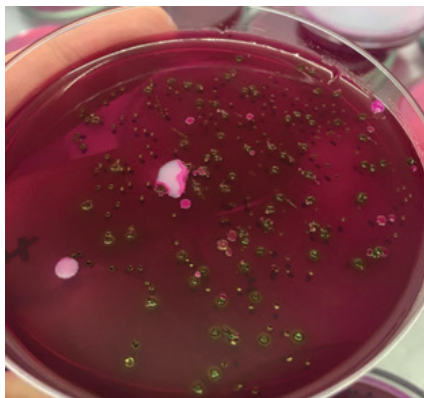
Для уплотнения питательных сред обычно используют *агар-агар* - полисахарид, получаемый при переработке некоторых красных и бурых морских водорослей. Впервые использовать агар для культивирования микроорганизмов предложил Р. Кох. Агар биологически инертен и, в отличие от желатина, несъедобен для большинства микроорганизмов. Другим его достоинством является то, что он остаётся плотным даже при 50 °С. При посеве на плотные питательные среды можно получить отдельные колонии, из которых получают чистые культуры для работы.

В зависимости от потребностей микроорганизма и цели исследований питательные среды также значительно различаются:

Классификация питательных сред по назначению

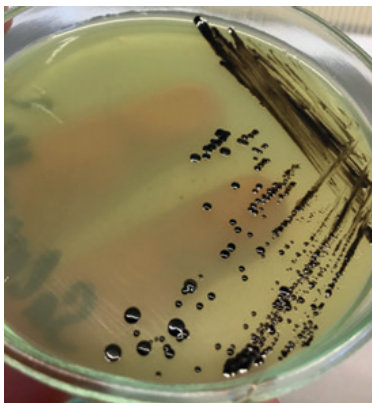
Виды питательных сред	Назначение	Примеры
Универсальные (основные)	Для культивирования нетребовательных микроорганизмов	Мясопептонный бульон (МПБ) Мясопептонный агар (МПА)
Специальные	Для культивирования требовательных микроорганизмов	Глюкозный МПБ, сывороточный МПБ, кровяной МПА, асцитические среды
	Для культивирования анаэробов	Среда Китта-Тароцци, среда Вильсона-Блера (железо-сульфитный агар)
Дифференциально-диагностические	Для дифференцирования микроорганизмов по биохимическим свойствам и(или) быстрого обнаружения определённого вида в клиническом материале	Среды: Эндо, Левина, Плоскирева, Висмут-сульфит агар, Гисса, Ресселя, Омелянского
Элективные или избирательные (среды обогащения)	Для преимущественного накопления определенных микроорганизмов, в то время как рост остальных подавлен	Например: щелочной агар, пептонная вода для холерного вибриона, Среды Леффлера, Ру – для дифтерийной палочки, Среды Плоскирева, Мюллера – для бактерий тифо-паратифозной группы ЖСА (желточно-солевой агар) – для стафилококков
Консервирующие (транспортные)	Для сохранения жизнеспособности микроорганизмов во время транспортировки	Глицериновая смесь
Селективные	Для дифференциации прототрофов от ауксотрофов	Для прототрофов – минимальная среда (МС): соли + глюкоза + NH_4Cl Для ауксотрофов: МС с добавлением факторов роста

Иногда нельзя провести чёткой границы между разными типами сред. Например, некоторые элективные ИПС, способствующие росту определённой группы бактерий, содержат в своём составе компоненты, которые позволяют внутри этой группы выделить определённый вид. В качестве примеров можно привести среду Эндо и висмут-сульфит агар (рис. 1-1):



А

А. Рост колоний бактерий на среде Эндо. В её состав входит лактоза и фуксинсернистая кислота. Наличие фуксина в среде препятствует росту грамположительной флоры, т.е. среда проявляет селективные свойства. Кишечная палочка усваивает лактозу и выделяется муравьиный альдегид, который восстанавливает свободный фуксин из фуксинсернистой кислоты. В результате колонии кишечной палочки окрашиваются в тёмно-красный цвет с зеленоватым металлическим блеском. Бактерии, не усваивающие лактозу, образуют белые или розовые колонии, т.е. среда является отчасти и дифференциально-диагностической, позволяя отличить колонии кишечной палочки от других бактерий



Б

Б. Рост колоний *Salmonella* sp. на висмут-сульфит агаре. В его состав входят цитрат висмута и бриллиантовый зелёный, которые резко угнетают развитие грамположительных и многих грамотрицательных бактерий (селективные свойства среды). При росте сальмонелл на этой среде выделяется сероводород, который приводит к образованию сульфида железа чёрного цвета. Поэтому колонии сальмонелл окрашиваются в чёрный цвет, часто с металлическим блеском. Бактерии, не образующие сероводород, образуют колонии бесцветные, зеленоватые или коричневые (дифференциальные свойства среды)

Рисунок 1-1. Примеры питательных сред, обладающих одновременно селективными и дифференциально-диагностическими свойствами:

Микроорганизмы, как патогенные, так и сапротрофные, в местах своего обитания редко встречаются как единственный вид в биоценозе. Поэтому, для установления этиологии инфекционного заболевания необходимо выделить патогенный вид бактерии из данного микробного сообщества. Для этого применяют разные методы, обычно основанные на принципе механического разобщения микробных клеток, каждая из которых затем на питательной среде образует отдельные колонии; эту процедуру называют *посевом* микроорганизмов на искусственную питательную среду. Полученные отдельные колонии в дальнейшем пере-

севают в пробирки или другие сосуды с питательной средой и изучают их биологические свойства.

Большинство патогенных для человека микроорганизмов растут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и образуют видимые колонии через 24...48 часов культивирования в термостате. Некоторые патогены растут медленнее, а возбудитель туберкулёза образует колонии через 3...4 недели после посева на питательную среду.

Посев микроорганизмов на питательную среду чаще всего проводят одним из двух способов - методом *посева по Дригальскому* и методом *истощающего штриха*.

ХОД РАБОТЫ

Подготовьте образец для посева. Жидкое отделяемое, гной, мокроту обычно разводят в небольшом количестве изотонического раствора, твердые образцы следует гомогенизировать в небольшом количестве изотонического раствора в стерильной фарфоровой ступке.

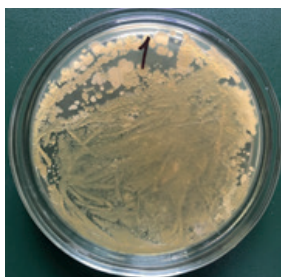
Часть 1. Посев по Дригальскому

Посев по Дригальскому проводится стеклянным, металлическим или пластиковым шпателем (рис. 1-2) в трёх чашка Петри.



Рисунок 1-2. Шпатель Дригальского

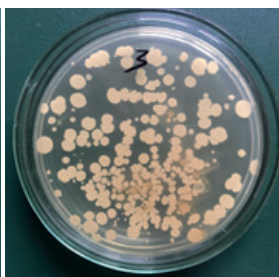
1. Поместите 1-2 капли исследуемого материала на поверхность питательной среды в первую чашку Петри.
2. Стерильным шпателем тщательно распределите образец по поверхности среды
3. Не стерилизуя шпатель повторите процедуру во второй и третьей чашках Петри.
4. Поместите посев в термостат
5. После появления роста бактерий (рис. 1-3) следует пересеять по одной колонии каждого типа на поверхность питательной среды в пробирке для дальнейшей работы.



В первой чашке наблюдается сплошной, «газонный» рост бактерий. Отдельные колонии выделить не получается



Во второй чашке уже можно наблюдать появление отдельных колоний. Однако они расположены всё ещё слишком близко друг к другу



В третьей чашке наблюдается рост изолированных колоний, которые можно отобрать петлёй для пересева в пробирки

Рисунок 1-3. Результат посева бактерий по Дригальскому

Часть 2. Посев методом истощающего штриха

Посев истощающим штрихом проводится в одной чашке Петри бактериологической петлёй.

1. Простерилизуйте бактериологическую петлю в пламени спиртовки и охладите её, коснувшись среды в чашке Петри.

2. Возьмите бактериологической петлёй немного исследуемого материала.

3. Мысленно разделите чашку Петри на три или четыре сектора.

4. Проведите петлёй с исследуемым материалом зигзагообразный штрих по поверхности среды в секторе 1 как показано на рисунке 1-4

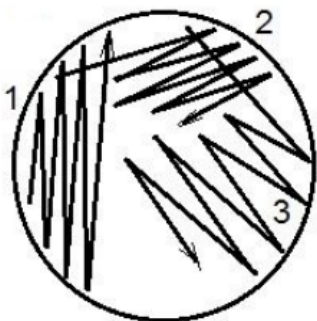
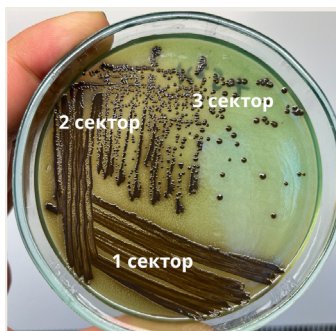


Схема посева бактерий методом истощающего штриха. Помните, что после нанесения каждого штриха петлю следует простерилизовать



Результат посева бактерий истощающим штрихом. Изолированные колонии наблюдаются только в конце штриха в 3 секторе

Рисунок 1-4. Техника проведения посева микроорганизмов методом истощающего штриха

5. Простерилизуйте петлю (!), охладите её (см. п. 1), однократно пересекайте штрих в секторе 1 и сделайте такой же в секторе 2.

6. Повторите процедуру в секторе 3.

7. После появления роста бактерий пересейте по одной колонии каждого типа на поверхность питательной среды в пробирке для дальнейшей работы.

Часть II. Методы стерилизации

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В микробиологии, медицине, пищевой промышленности для борьбы с нежелательными микроорганизмами используют в основном действие высокой температуры.

Основные методы обеззараживания представлены на схеме 1-1.

Помимо воздействия высоких или низких температур для подавления нежелательной микрофлоры широко используются химические вещества. Химические вещества, применяемые для борьбы с микроорганизмами, называют антисептиками или дезинфектантами. Они могут оказывать:

- Бактериостатическое действие: Некоторые вещества способны останавливать рост и размножение микроорганизмов

- Бактерицидное действие: Некоторые вещества при контакте способны вызывать гибель микроорганизмов

Механизмы действия наиболее распространённых дезинфектантов представлены на схеме 1-2:

ХОД РАБОТЫ

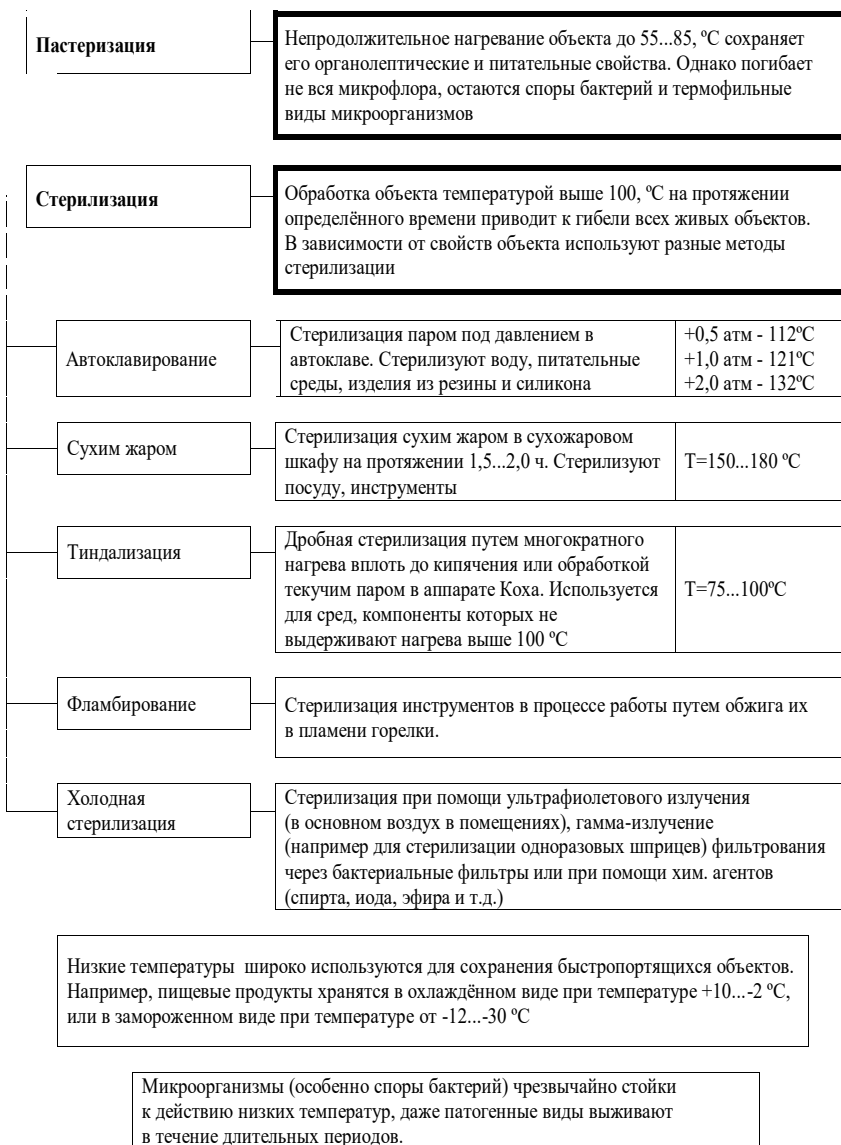
1. Приготовьте в стерильном изотоническом растворе суспензию (10^6 кл/мл) бактерий:

а) флакон №1 – *Escherichia coli* (кишечная палочка)

б) флакон №2 – *Bacillus subtilis* (сенная палочка, спорообразующая бактерия). Окрасьте мазок *Bacillus subtilis* по Шефферу-Фултону (см. Практикум по методам изучения морфологии микроорганизмов), чтобы убедиться, что бактерии активно образуют споры

2. Возьмите 8 пробирок с 10 мл тиогликолевой среды в каждой. В первые четыре пробирки внесите по 0,1 мл суспензии *Escherichia coli*, во вторые четыре – по 0,1 мл *Bacillus subtilis*.

ТЕРМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ



ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Бактерицидные вещества по их действию на микроорганизмы подразделяют на:		
Поверхностно-активные вещества	Жирные кислоты, спирты, детергенты (мыло) и др.	Скапливаясь на границе раздела фаз, нарушают функционирование клеточной стенки и ЦПМ
Соли тяжёлых металлов	Золото, серебро, цинк, свинец, соли ртути и др.	Вызывают коагуляцию (свёртывание) белков клеток микроорганизмов
Окислители	Иод, хлор, перманганат калия, перекись водорода и др.	Нарушают деятельность ферментов, взаимодействуют с компонентами мембран клетки
Органические кислоты	Уксусная, салициловая, сорбиновая, молочная и др.	Разрушают полипептидную оболочку клеток
Неорганические кислоты и щелочи	Соляная, серная, азотная, сернистая; КОН, NaOH и др.	Вызывают коагуляцию белков
Группа формальдегида	Формалин (40% р-р формальдегида)	Вызывает денатурацию белков
Фенол и его производные	Карболовая кислота, крезол	Повреждает клеточную стенку и белки клетки

3. Согласно схеме, приведённой ниже, подвергните образцы раз-
личному режиму стерилизации:

Пробирка №1 контроль (без воздействия)	Пробирка №2 пастеризация при 80 °С 15 минут	Пробирка №3 довести до кипения	Пробирка №4 автоклавирование при 121 °С 15 минут
--	---	--------------------------------------	--

Цвет только что засеянной среды – жёлтый, среда прозрачна.

4. Поместите пробирки в термостат при 37 °С на 48...72 часа.

5. Осмотрите пробирки и сделайте выводы об эффективности раз-
ных методов стерилизации для разных видов бактерий

Рост бактерий в среде устанавливают по её помутнению, также можно после инкубации можно в каждую пробирку внести 1 мл рабочего раствора индикатора бромтимоловый синий для **обнаружения органических кислот, которые образуются при усвоении бактериями глюкозы**, содержащейся в питательной среде. Этот индикатор при нейтральном рН имеет зелёный цвет, в кислой – **жёлтый**.

После инкубирования можно наблюдать следующие результаты:

Вариант	Escherichia coli			Bacillus subtilis		
	Помутнение среды	Цвет индикатора	Эффективность метода	Помутнение среды	Цвет индикатора	Эффективность метода
Пробирка №1 контроль	да		—	да		—
Пробирка №2 пастеризация при 80 °С 15 минут	нет		да (гибель бактерий)	да		нет (эндоспores выжили)
Пробирка №3 довести до кипения	нет		да (гибель бактерий)	да		нет (эндоспores выжили)
Пробирка №4 автоклавирование при 121 °С 15 минут	нет		да (гибель бактерий)	нет		да (гибель бак- терий и их эндоспор)

Лабораторная работа № 2

Получение чистой культуры бактерий. Культуральные свойства бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Способы размножения бактерий 2. Принципы и условия культивирования бактерий. 3. Характер роста на плотных и жидких питательных средах. 4. Развитие бактериальной популяции. 1. Свечение, пигменто- и ароматообразование у бактерий.	Таблица: Характеристика морфологии и микроскопического состава выделенных колоний. Рис.: формы колоний	Таблицы: 1. Схема выделения чистой культуры аэробных бактерий. 2. Схема выделения чистой культуры анаэробных бактерий. 3. Классификация бактериальных культур

Часть I. Получение чистой культуры бактерий

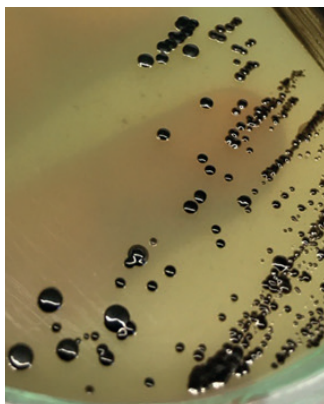
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Микроорганизмы, выросшие на питательной среде называются **культурой**. Культура микроорганизмов, состоящая из одного вида микроорганизмов называется **чистой**, из нескольких видов – **смешанной**. В подавляющем большинстве случаев работы по изучению микроорганизмов проводятся с чистой культурой; если работа по идентификации микроорганизма проводится на основе изучения фенотипических признаков – это обязательное условие.

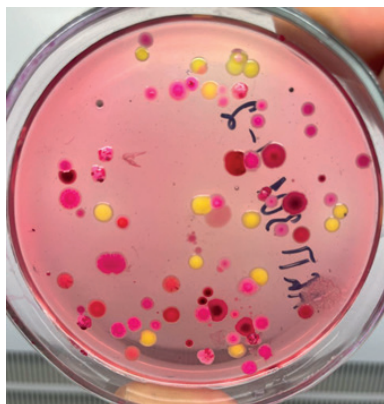
После правильно проведенного посева на плотную питательную среду микроорганизмы образуют видимые невооружённым глазом скопления – **колонии** (рис. 2-1).

Ранее считалось, что каждая колония представляет собой совокупность потомков одной клетки, однако дальнейшие исследования показали, что предшественником колонии может быть либо отдельная клетка, либо группа родственных клеток; поэтому такая клетка или группа клеток называется **колониеобразующей единицей (КОЕ)**.

При всех микробиологических процедурах необходимо соблюдать правила асептики, чтобы снизить вероятность загрязнения чистой культуры посторонними микроорганизмами - **контаминации**. Причиной контаминации обычно служат инструменты или потоки воздуха с



А



Б

Рисунок 2-1. Различные типы бактериальных колоний.
А – чистая культура, Б – смешанная

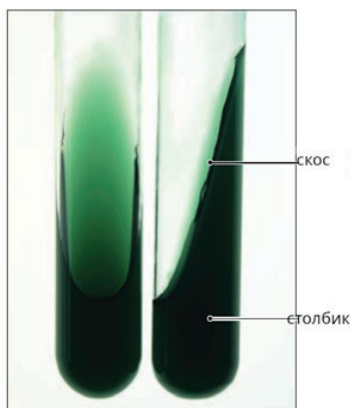


Рисунок 2-2. Пробирки со скошенным агаром

которыми чужеродные микробы могут попасть чашки Петри, пробирки или другие сосуды для культивирования микроорганизмов. Все среды, сосуды и инструменты должны быть стерильными, то есть свободными от каких-либо микробных загрязнений.

Для получения чистой культуры нежелательно использовать селективные среды: там могут находиться живые, но неспособные размножиться посторонние микроорганизмы, которые при пересеве попадут вместе с нужными микробами на неселективную среду и начнут размножаться вместе с исследуемым организмом, что приведёт к искажению результатов тестов.

Длительное культивирование бактерий в чашках Петри как правило не проводят: питательная среда быстро высыхает и микробы погибают. Обычно, после появления видимых колоний в чашке Петри их описывают и, для дальнейшего культивирования и изучения, переносят в пробирки со скошенным агаром (рис. 2-2). Такая форма среды облегчает посев и обеспечивает хороший газообмен культуры.

ХОД РАБОТЫ

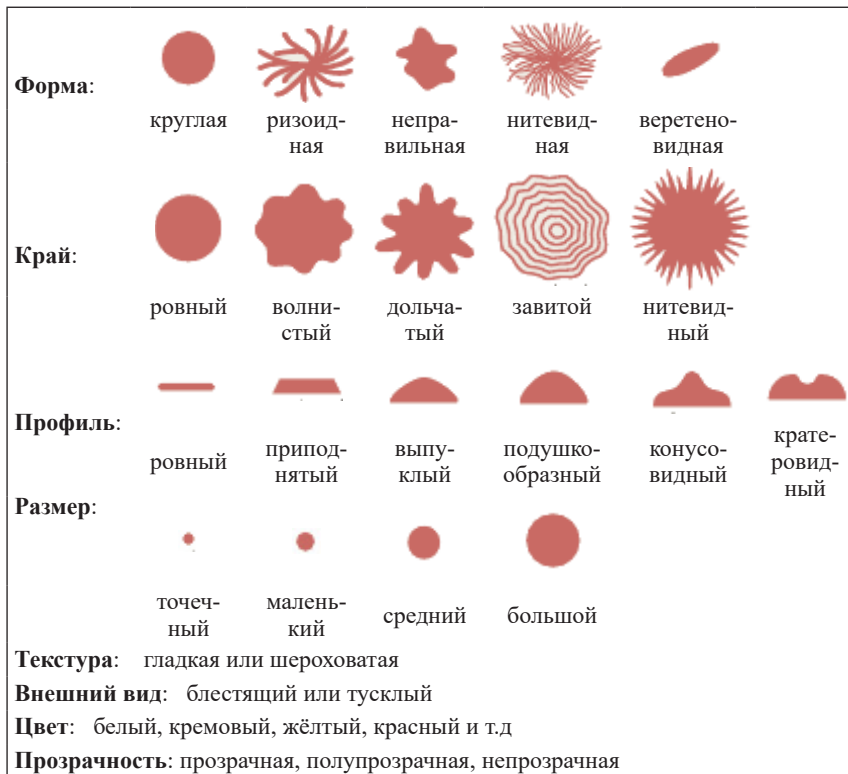
Этап I. Описание морфологии колоний

1. Рассмотрите чашки Петри с посевом, выполненным в ходе лабораторной работы №1.

2. Установите количество типов колоний, которые выросли на поверхности среды

3. Используя увеличительное стекло или малое увеличение микроскопа опишите каждый тип колоний, согласно схеме, приведённой ниже:

Схема: Описание морфологии бактериальных колоний



Этап II. Пересев бактерий на скошенный агар

1. Выберите один из типов колоний в чашке Петри

2. Прокалите петлю в пламени горелки, откройте чашку Петри и охладите петлю, коснувшись незасеянного участка среды

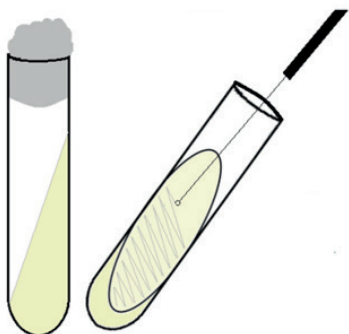


Рисунок 2-3. Техника посева на скошенный агар

3. Возьмите петлёй немного биомассы бактерий из выбранной колонии

4. Откройте пробирку со скошенным агаром, зажав пробку в мизинце правой руки

5. Внесите петлю с биомассой в пробирку и распределите её по поверхности скоса так, как показано на рисунке 2-3:

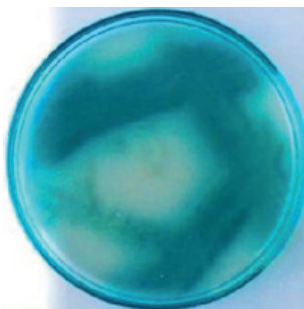
6. Прокалите петлю для её обеззараживания, положите её на рабочий стол.

7. Закройте и подпишите пробирку

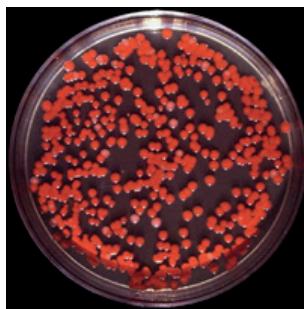
Часть II. Пигментообразование бактерий

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Некоторые виды бактерий в процессе жизнедеятельности синтезируют окрашенные соединения, которые называются пигментами. Они могут быть водорастворимыми или растворяться в неполярных растворителях, таких как эфир или бензол. В первом случае пигмент окрашивает питательную среду, во втором - окрашенными будут только сами колонии микроорганизма (рис. 2-4). Некоторые пигменты флюоресцируют в ультрафиолетовом свете (рис. 2-5).



Синий водорастворимый пигмент пеоцианин бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Окрашены и колонии и среда вокруг них



Красный нерастворимый в воде пигмент продигиозин бактерии *Serratia marcescens*. Окрашены только колонии

Рисунок 2-4. Примеры пигментообразования бактерий

Способность микроорганизма образовывать пигменты – очень важный диагностический признак.

Пигментообразование – стабильный признак, как правило, проявляющийся достаточно отчётливо. Однако, в некоторых случаях, для обнаружения способности бактерий образовывать пигмент необходимо проводить посев на среды специального состава, которые стимулируют выработку пигментов. Примерами таких сред можно назвать среду Кинг А для синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), Кинг Б для флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas* или молочно-солевой агар для *Staphylococcus aureus*.

ХОД РАБОТЫ

1. Приготовьте среду Кинг Б и разлейте её по чашкам Петри.

Состав среды:

Компонент	Количество
Пептон	20 г
Глицерин	10 г
$K_2HPO_4 \cdot 6H_2O$	1,5 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 г
Агар	15 г
Вода дистиллированная	1 л

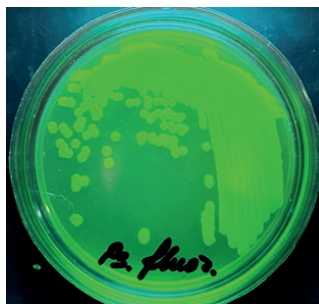
Ингредиенты следует растворить в воде, довести до кипения, разлить по колбам и стерилизовать автоклавированием при 1,0 атм. 15 минут. Дать остыть до 50 °С, разлить по чашкам Петри, после застывания провести посев.

2. Разделите чашку на три или четыре сектора и произведите посев исследуемых бактерий методом бляшек, диаметром 1,5...2 см. В качестве положительного контроля используйте культуру бактерий *Pseudomonas fluorescens*.

3. Через неделю просмотрите посев в ультрафиолетовом свете. Отметьте штаммы, продуцирующие пигмент флюоресцеин.



А



Б

Рисунок 2-5. Образование флюоресцеина бактериями р. *Pseudomonas*: А- штаммы 1088а и 1060в положительных результат; штамм 1067б не принадлежит р. *Pseudomonas*, взят как отрицательный контроль. Посев методом бляшек, освещение ультрафиолетом. Б – типовой вид рода *Pseudomonas* – *P. fluorescens*

Лабораторная работа № 3

Схемы идентификации бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Общие подходы к идентификации 2. Выбор схемы идентификации бактериальной культуры 3. Первые этапы идентификации	Таблица: Характеристика свойств выбранного для идентификации штамма	1. Принципы идентификации бактериальной культуры 2. Результаты проведения тестов по первоначальной идентификации штамма

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Идентификация микроорганизма – это установление его принадлежности к определённому биологическому виду. Идентификация основана на установлении свойств изучаемого штамма, то есть совокупности признаков, которыми обладают все или большинство представителей того или иного вида, а представители других видов – не обладают.

В настоящее время, несмотря на развитие молекулярно-генетических методов, по-прежнему в большинстве случаев идентификация микроорганизмов основывается на их фенотипических признаках. Приступая к идентификации выделенного штамма следует выбирать

те признаки, которые стабильно проявляются у большинства штаммов данного вида. Наличие того или иного признака у микроорганизма зависит от наличия или отсутствия соответствующего гена (генов) которые детерминируют данный морфологический или физиологический признак. Таким образом, изучая фенотипические свойства мы косвенно описываем генотип данного штамма.

Для построения схемы идентификации:

1. Выбирайте признаки, которые легко определить;
2. Старайтесь выбрать минимальное число признаков из доступных;
3. Переходите от крупных категорий к более мелким;
4. Используйте стандартные методики;
5. Выбирайте тесты, дающие чётко положительный или отрицательный результат;

Следует понимать, что для некоторых видов, например представителей семейства энтеробактерий, схема идентификации, включающая минимальный набор определяемых признаков, будет ненадёжной; для таких бактерий приходится определять широкий спектр свойств.

Для облегчения идентификации таких объектов желательно использовать коммерческие тест-системы, позволяющие одновременно провести определение целого ряда признаков. Такие системы дают легко воспроизводимые результаты, анализ проводится в стандартизованных условиях, есть возможность автоматического считывания и анализа результатов. Примеры таких систем представлены на рисунках 3-1 и 3-2.

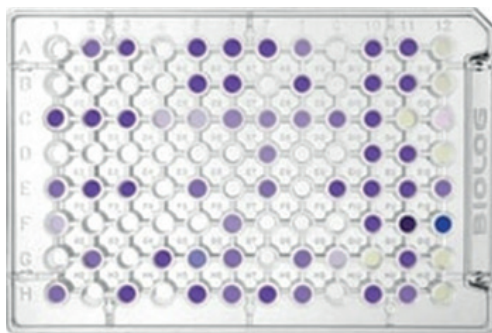


Рисунок 3-1. Система идентификации Biolog Gen III. Представляет собой полистирольную плашку с лунками, куда внесены вещества, которые могут быть усвоены бактериями. Суспензию бактерий вносят в каждую из лунок. При усвоении тех или иных субстратов изменяется окислительно-восстановительный потенциал в лунке и индикатор приобретает фиолетовый цвет. Через 2...3 часа инкубации плашку помещают в прибор для считывания результатов и компьютер определяет совпадение фенотипа изучаемой бактерии с базой данных. Такие же системы разработаны для дрожжеподобных и мицелиальных грибов

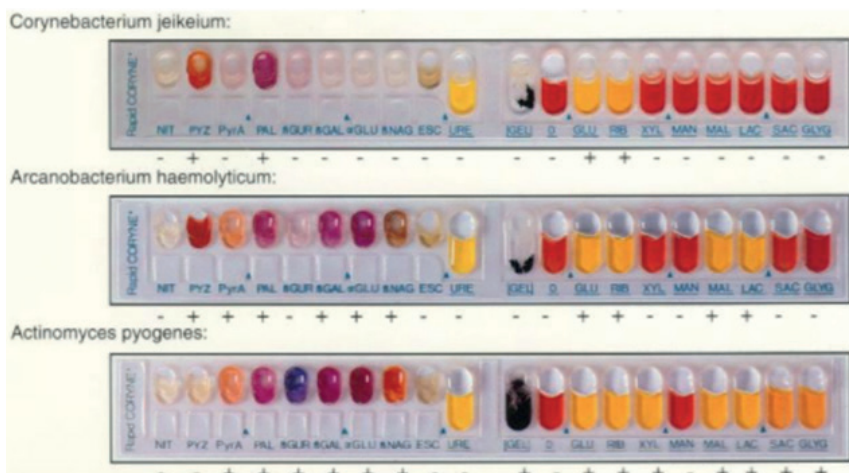


Рисунок 3-2. Тест системы с меньшим количеством обнаруживаемых признаков

Микроорганизмы чрезвычайно чутко реагируют на изменение условий обитания и быстро приспосабливаются к ним. Такие условия выращивания как химический состав питательной среды, осмотическое давление, температура инкубации, доступность или недоступность свободного кислорода – всё это сильно влияет на обмен веществ микробов и, следовательно, на результаты фенотипических тестов. Даже такой признак как тип клеточной стенки бактерии (определяется при окраске по Граму) может быть определён неверно, если окрашивание проводится на старой культуре.

Некоторые признаки могут кодироваться генами, расположенными на плаزمиде или в составе профагов. Такие признаки очень изменчивы – у одним штаммов они есть, у других их может не быть, либо они могут быть слабо выраженными. Поэтому необходимо использовать стандартные методики при проведении исследований и желательно параллельно с изучаемым штаммом параллельно проводить те же тесты на хорошо изученной типовой культуре из национальной или международной коллекции микроорганизмов.

Необходимо подбирать тесты, результаты которых не могут быть истолкованы двояко: слабая положительная реакция не должна быть оценена как отрицательный результат и наоборот.

В качестве примера рассмотрим схему идентификации выделенных из клинического образца кокковидных бактерий (рис. 3-3).

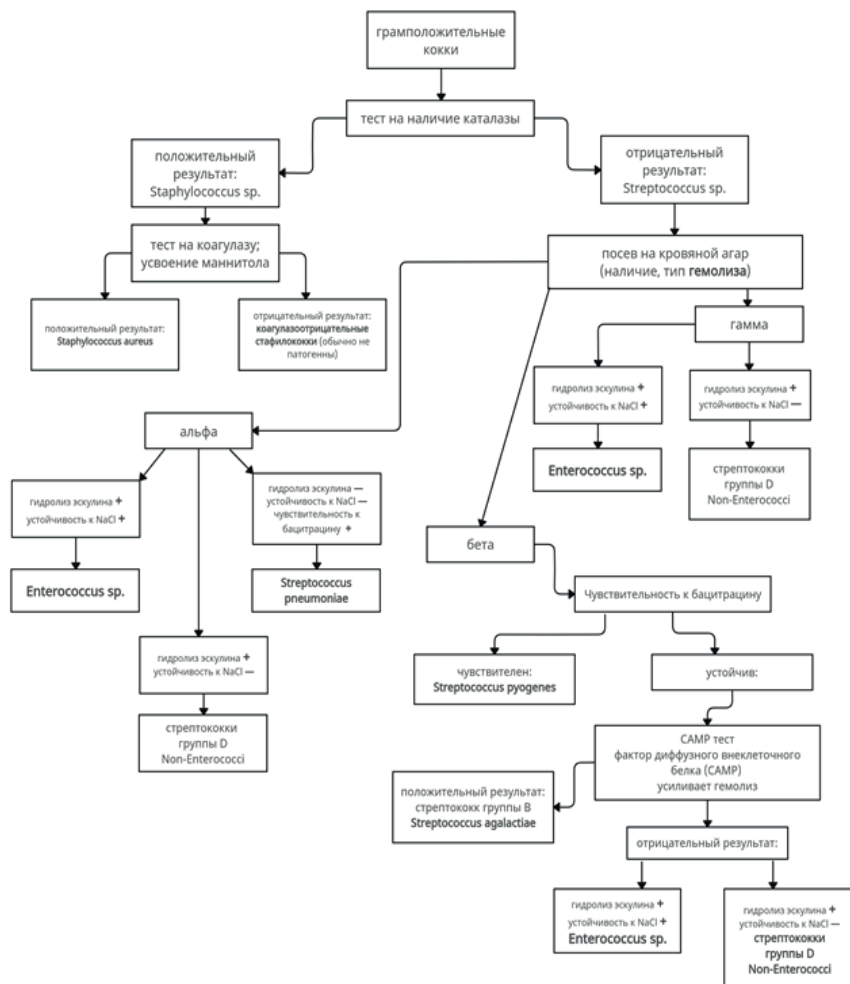


Рисунок 3-3. Схема идентификации грамположительных кокковидных бактерий

Первым этапом идентификации является приготовление фиксированного мазка и окраска его по Граму. На этом этапе мы определяем форму бактерий (кокки) и устанавливаем тип клеточной стенки (грамположительные). Таким образом мы сужаем круг возможностей, исключая из исследования большую группу грамотрицательных кокковидных бактерий.

На втором этапе мы устанавливаем способность бактерий продуцировать фермент *каталазу*; по результатам этого несложного теста мы устанавливаем принадлежность выделенной бактерии к стафилококкам (продуцируют каталазу) или стрептококкам (каталазонегативные). Дальнейший ход идентификации будет основан на тестах, отличающихся для этих двух групп бактерий.

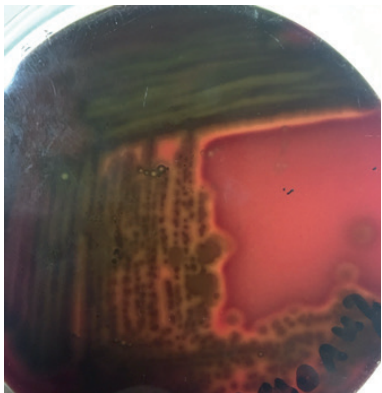
Для бактерий, идентифицированных нами как стафилококки мы проведём два теста: тест на способность продуцировать фермент *плазмокоагулазу* (важнейший фактор патогенности), вызывающий свёртывание плазмы крови и тест на способность усваивать шестиатомный спирт *маннитол* в качестве источника углерода и энергии. Если результаты обоих этих тестов будут положительны, то выделенный нами штамм – это золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*). Другие представители рода *Staphylococcus* обычно обитают на коже и слизистых и редко вызывают проблемы со здоровьем.

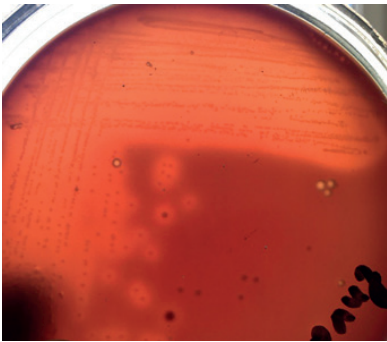
Для стрептококков наиболее важным диагностическим тестом, позволяющим разделить их на подгруппы, является тест на способность вызывать разрушение элементов крови – *гемолиз*. Различают гемолиз трёх типов: альфа-, бета- и гамма-гемолиз (см. табл. 3-1).

Для определения гемолитической активности проводят посев на кровяной агар

Таблица 3-1

Виды гемолиза

Тип	Характер изменений	Внешний вид
альфа	Происходит неполное разрушение эритроцитов и образование метгемоглобина. В результате вокруг колоний образуются зоны, окрашенные в серо-зелёный цвет. Такие стрептококки называют зеленящими	

Тип	Характер изменений	Внешний вид
бета	Происходит полное разрушение эритроцитов с образованием прозрачных зон вокруг колоний. Такие стрептококки называют бета-гемолитическими	
гамма	Отсутствие гемолиза, либо изменения, не видимые невооружённым глазом	Не изменяется

После определения типа гемолиза и, соответственно, причисления выделенного штамма к одной из трёх групп, необходимо провести дальнейшую дифференцировку. Она проводится на основании чувствительности бактерий к антибиотическому веществу *бацитрацин*, способности расти при повышенных концентрациях в среде NaCl и способности гидролизовать растительный глюкозид *эскулин*. Для некоторых стрептококков, таких как *Streptococcus agalactiae* необходимо провести САМР-тест. САМР – это диффундирующий в среду протеин, который взаимодействует с гемолизином *Staphylococcus aureus*, значительно усиливая его действие (описание теста и результат приведены в лабораторной работе №7).

На основании различий в этих тестах проводится внутригрупповая дифференциация.

Для других бактерий разработаны другие схемы идентификации, которые могут быть проще или сложнее рассмотренной выше. Например, схема идентификации вариантов кишечной палочки (*Escherichia coli*) приведена на рисунке 3-4.

В первый день исследования патологический материал (рвотные массы, кал, гной, кровь, мочу) помещают в стерильный изотонический раствор или смесь изотонического раствора и глицерина и отправляют в лабораторию. В этот же день проводят посев на среду Эндо.

На второй день характерные для кишечной палочки колонии (см. рис. 1-1А) отбирают для дальнейшего исследования. Проводят реак-

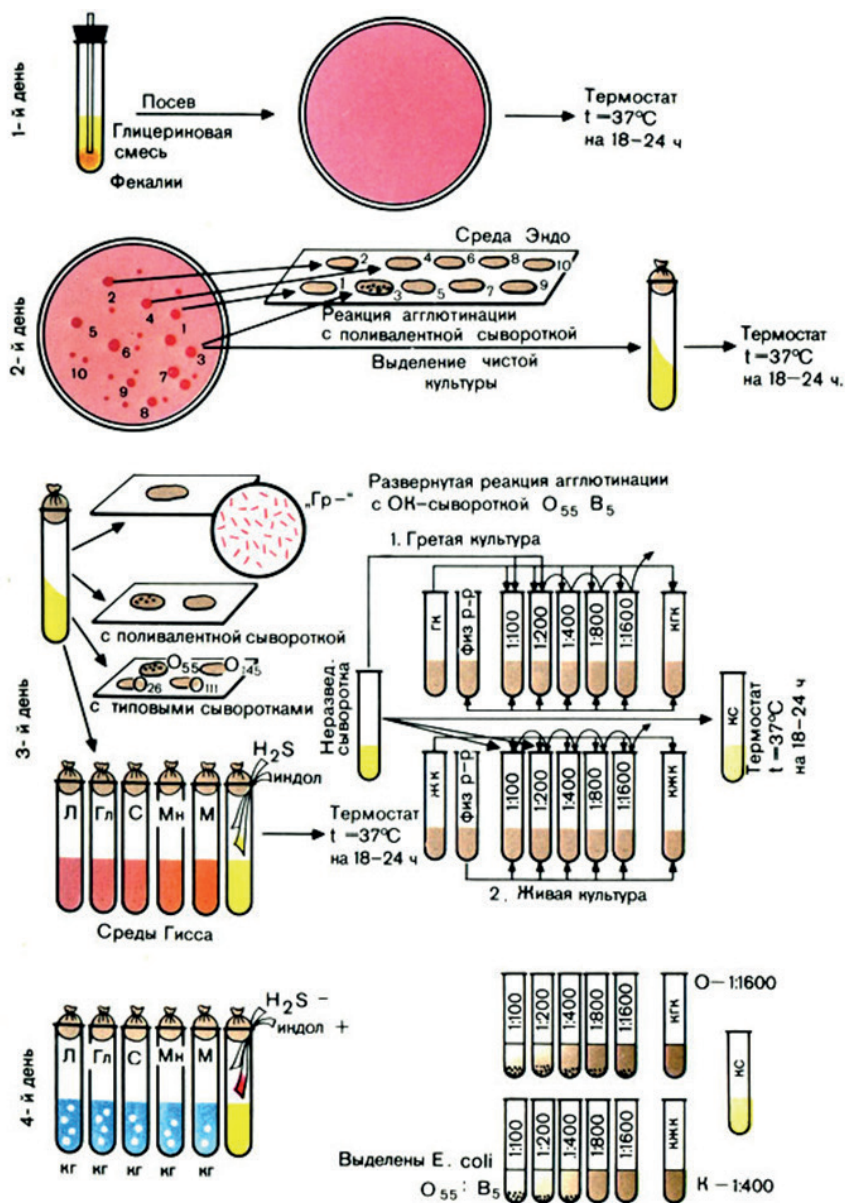


Рисунок 3-4. Схема идентификации
энтеропатогенных *Escherichia coli*.

цию агглютинации с поливалентной сывороткой и те колонии, которые дали положительную реакцию, пересевают на скошенный агар.

На третий день просматривают посевы и проводят посев на пёстрый ряд (среды Гисса и белковые среды) для определения ферментативной активности. Также проводят развернутую реакцию агглютинации с живой культурой для определения К-антигена и культурой, убитой нагреванием – для определения О-антигена.

На четвёртый день проводят учёт биохимических свойств на средах Гисса, учитывают образование кислоты и газа на средах с углеводами, образование индола и отсутствие выделения сероводорода на мясопептонном бульоне.

ХОД РАБОТЫ

1. Выберите один из штаммов, полученных в ходе лабораторной работы №2.

2. Приготовьте фиксированный мазок культуры и окрасьте его по Граму

3. Установите форму бактерий, тип клеточной стенки

4. Приготовьте нативный препарат изучаемого штамма

5. Рассмотрите препарат под малым увеличением микроскопа, определите подвижность бактерий

6. Предложите схему по дальнейшей работы по идентификации, обсудите её.

Лабораторная работа № 4

Определение потребности бактерий в кислороде.

Определение цитохромоксидазы и каталазы у бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Отношение бактерий к кислороду 2. Дыхательные ферменты бактерий 3. Роль свободного кислорода в жизнедеятельности бактерий	Таблица: Характеристика свойств выбранного для идентификации штамма	1. Результаты проведения теста на окисление-сбраживание 2. Результаты определения каталазы и оксидазы

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Часть I. Определение потребности бактерий в кислороде

По отношению бактерий к кислороду их делят на три группы:

а) строгие (облигатные) аэробы. Обладают окислительным типом дыхания, используя кислород в качестве акцептора ионов водорода или электронов. Без кислорода такие микроорганизмы жить не могут

б) факультативные анаэробы. Способны осуществлять свою жизнедеятельность как в присутствии кислорода в среде, так и без него.

в) строгие (облигатные) анаэробы. Живут только в анаэробных условиях, кислород для них ядовит, поскольку у них нет ферментов, разлагающих перекись водорода и супероксидный анион кислорода, которые вырабатываются клеткой в кислородной среде.

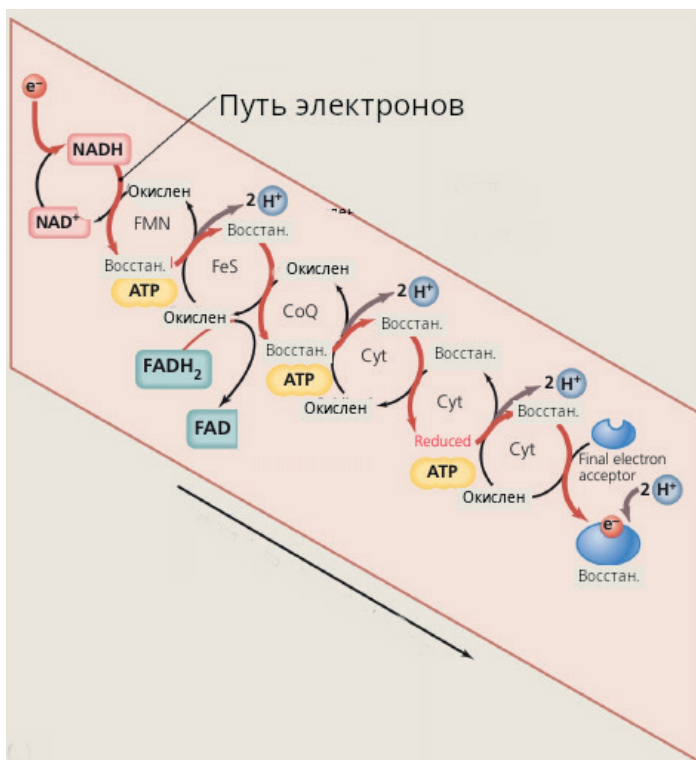
Способ определения пути метаболизма глюкозы (окисление или сбраживание) был открыт Хью и Лейфсоном в 1953 г. при изучении псевдомонад, колиформных и сходных организмов.

Предложенный способ оказался прост в исполнении и надёжен и получил широкое распространение под названиями *проба Хью-Лейфсона*, *окислительно-ферментативный (ОФ) тест*, *O-F test*. Он основан на том, что при усвоении углеводов бактериями образуются органические кислоты, которые выделяются в среду и меняют цвет индикатора.

Часть II. Определение цитохромоксидазы

Метаболизм как совокупность биохимических реакций является результатом действия множества ферментов. У организмов, использующих дыхание, наибольшее количество АТФ производится не посредством гликолиза или цикла Кребса, а посредством поэтапного высвобождения энергии в результате серии окислительно-восстановительных реакций, известных как электрон-транспортная цепь. Она состоит из ряда связанных с мембраной молекул-переносчиков, которые передают электроны от одной к другой и в конечном итоге к конечному акцептору электронов.

Цепи переноса электронов расположены в цитоплазматических мембранах прокариот. Такие переносчики как NADH и FADH₂ могут отдавать электроны в виде атомов водорода (электронов и протонов), многие другие переносчики могут передавать по цепи только электроны. В транспортных цепях есть четыре категории переносчиков, которые чередуют свое состояние между окисленным и восстановленным (рис. 4-1):



*Рисунок 4-1. Путь электронов в электрон-транспортной цепи.
При перемещении электронов от переносчика к переносчику (красные стрелки)
высвобождается энергия, которая может запасаться в виде АТФ*

1. **Флавопротеины.** Это сложные мембранные белки, многие из которых содержат флавин, кофермент, полученный из рибофлавина (витамин В2). Одной из форм флавина является флавинмоноклеотид (ФМН), который является начальной молекулой-носителем
2. **Убихиноны.** Это жирорастворимые, небелковые переносчики, которые получили своё название потому что присутствуют повсеместно в клетках. Предшественников убихинонов является витамин К.
3. **Металлсодержащие белки.** Это гетерогенная группа сложных белков, содержащих атомы железа, серы или меди.
4. **Цитохромы.** Это белки, связанные с гемом, который является той же железосодержащей, небелковой, пигментированной молекулой,

которая содержится в гемоглобине крови. Железо может находиться в восстановленном (Fe^{2+}) и окисленном (Fe^{3+}) состоянии. Исследователи назвали цитохромы буквами и цифрами в соответствии с порядком, в котором они их идентифицировали, поэтому последовательность молекул-носителей может показаться неупорядоченной; например, цитохром *b* может встречаться перед цитохромом *a* в цепи переноса электронов.

У аэробных микроорганизмов для осуществления дыхания (биологического окисления с целью получения энергии) имеется оксидаза цитохрома С – конечный фермент электрон-транспортной цепи. Это гемопротеин (железосодержащий белок), катализирующий перенос электронов от вещества-донора (например, NADH) к веществам-реципиентам (обычно O_2) (рис. 4-2).

Молекулы-переносчики в цепях переноса электронов различны; у бактерий обычно молекулы-переносчики расположены в других последовательностях, чем у архей или митохондрий эукариот. Даже среди бактерий состав молекул-переносчиков может различаться. Определение наличия этого фермента очень важно в процессе идентификации многих организмов, например бактерии рр. *Neisseria*, *Vibrio*, *Campylobacter* все оксидазоположительные, внутри р. *Pseudomonas* есть оксидазоотрицательные и оксидазоположительные виды, а все

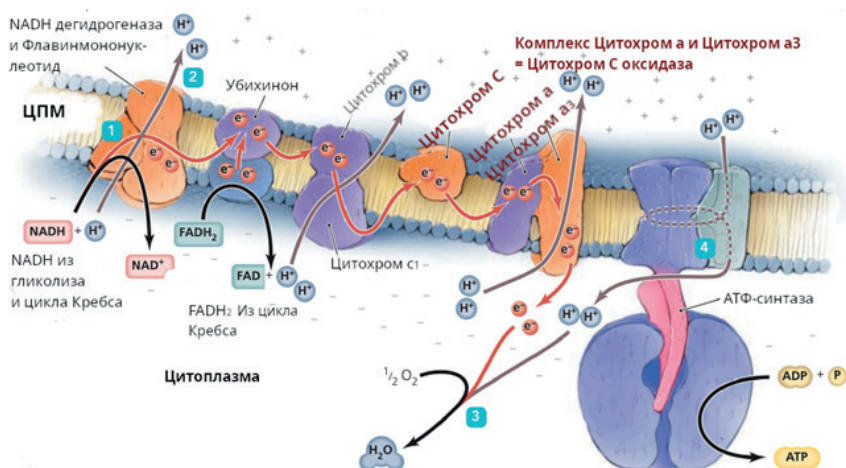


Рисунок 4-2. Расположение цитохромоксидазы в электрон-транспортной цепи

представители семейства энтеробактерий - оксидазоотрицательны, поэтому этот биохимический признак широко используют в схемах идентификации бактерий, в том числе для быстрого отделения кишечной палочки от биологически сходных видов при санитарном анализе объектов окружающей среды.

Этот тест прост в исполнении и достаточно надёжен. Наибольшее распространение получили два метода:

Метод Габри-Хадли (Gaby-Hadley). В этом тесте используют альфа-нафтол и бесцветный N,N-*ди*метил-парафенилендиамин, который служит искусственным реципиентом электронов. В ходе оксидазного теста из него в результате окислительно-восстановительных реакций с участием микробной оксидазы образуется окрашенное соединение - *индофеноловый синий*.

Метод Ковача. Используют N,N,N',N'-*тетра*метил-парафенилендиамина дигидрохлорид. При положительном результате теста реактив окисляется с образованием красителя *вурстеровского синего* и колонии оксидазоположительных бактерий окрашиваются в пурпурно-бордовый цвет.

Часть III. Обнаружение каталазы у бактерий

Биологическое значение каталазы - расщепление токсичной для живых клеток перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Помимо этого фермент катализирует ряд важных для метаболизма реакций.

У бактерий каталаза, в основном (до 90%), локализована в цитоплазме, однако около 10 % фермента связано с клеточной стенкой. Фермент может быть также слабо связан с внутриклеточными складками цитоплазматической мембраны наподобие связи человеческой каталазы с внутренней мембраной эритроцитов. Подобная локализация бактериальных ферментов увеличивает их эффективность и позволяет разделять в пространстве цепи метаболических реакций.

Каталаза обнаружена у всех аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. У облигатных анаэробов она встречается значительно реже и основную функцию защиты от свободных радикалов кислорода выполняет, по-видимому, супероксиддисмутаза, обладающая на порядок более слабой активностью.

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Проведение пробы Хью-Лейфсона (O-F test)

Тест проводится на питательной среде следующего состава (среда Хью-Лейфсона):

Пептон	2,0 г
Глюкоза	10,0 г
NaCl	5,0 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г
Агар	3,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл
Бромтимолблау (бромтимоловый синий) (индикатор), 1 % водный раствор	3,0 мл

Ингредиенты растворяются в воде, устанавливается pH 7,1, среда фильтруется, добавляется индикатор. Готовую среду разливают по пробиркам и стерилизуют при 120 °C 20 минут. Тест можно также проводить на жидкой среде, без добавления агара.

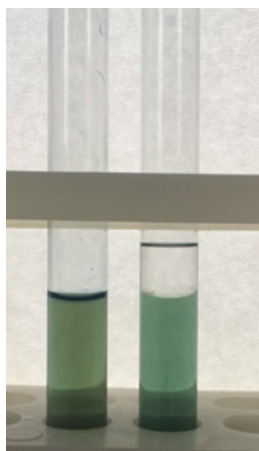
Индикатор бромтимоловый синий (бромтимолблау) в нейтральной среде зелёного цвета, в кислой среде - жёлтого, а в щелочной - синего.

1. Исследуемый штамм засевают одновременно в две пробирки.
2. После посева одну из пробирок заливают стерильным минеральным (парафиновым или вазелиновым) маслом слоем 1 см для создания анаэробных условий.
3. Инкубируют пробирки 72 часа или более в термостате.
4. Учитывают результаты теста по изменению цвета индикатора в среде (согласно таблице 4-1)

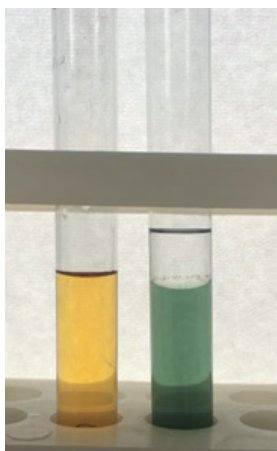
Таблица 4-1

Возможные результаты пробы Хью-Лейфсона

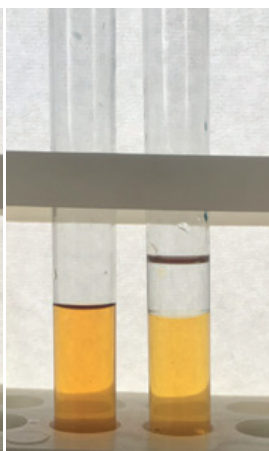
Цвет индикатора в пробирке:		Тип метаболизма	Группа
без масла	с маслом		
жёлтый	зелёный	окислительный	строгий аэроб
жёлтый	жёлтый	бродильный	факультативный анаэроб
синий	зелёный	несахаролитическая бактерия (см. <i>Примечание 2</i> под рисунком 4-3)	



Сразу после посева цвет индикатора в обеих пробирках зелёный. (См. примечания)



Изменение цвета индикатора на жёлтый только в пробирке с доступом кислорода свидетельствует, что данная бактерия - **строгий аэроб** (метаболизм возможен только в аэробных условиях)



Изменение цвета индикатора на жёлтый в обеих пробирках свидетельствует, что изучаемая бактерия - **факультативный анаэроб** (глюкоза усваивается как в аэробных, так и в анаэробных условиях)

Рисунок 4-3. Возможные результаты пробы Хью-Лейфсона

Примечание 1. Необходимо иметь ввиду, что штамм может не усваивать глюкозу, но усваивать другие сахара. В этом случае глюкоза может быть заменена другими углеводами.

Примечание 2. Некоторые бактерии в качестве источника углерода и энергии усваивают не углеводы, а другие соединения, например белки. В данном случае цвет индикатора либо не изменится (отсутствие жизнедеятельности), либо поменяется на синий, поскольку продуктами усвоения пептона в среде являются вещества с щелочной реакцией.

Примечание 3. Следует иметь ввиду, что индикатор бромтимоловый синий может быть токсичен для некоторых видов бактерий. В этом случае используют другой индикатор

Часть II. Определение цитохромоксидазы методом Габи-Хадли

1. Для проведения теста понадобятся два раствора:

Раствор А: 1 % спиртовой раствор альфа-нафтола

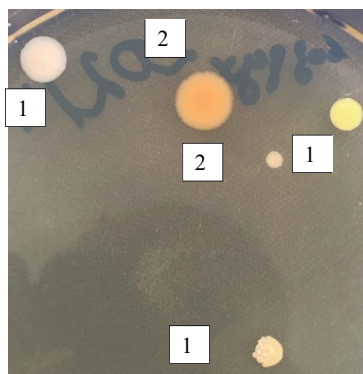
Раствор Б: 1 % водный **диметил-парафенилендиамин** (нестоек, готовят *ex tempore*).

2. Перед проведением опыта смешивают оба раствора: три части раствора А и семь частей раствора Б.

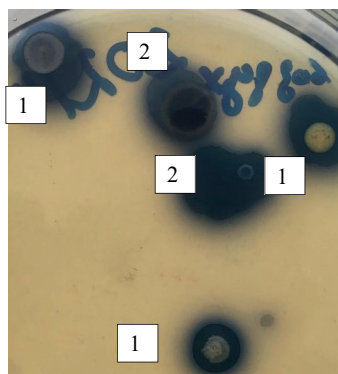
Важно: для предотвращения ложноположительных результатов при проведении опыта нельзя использовать нихромовую или сделанную из других окисляемых металлов петлю.

3. Полученным раствором пропитывают фильтровальную бумагу; платиновой или одноразовой пластиковой петлёй отбирают биомассу бактерий изучаемого штамма и наносят на фильтровальную бумагу. При наличии оксидазы у изучаемого микроорганизма в течение 1...3 минут биомасса становится синего цвета.

Можно также нанести готовый рабочий раствор непосредственно на колонию в чашке Петри, результат также регистрируют в течение 1...3 минут (не дольше) (рис. 4-4).



до нанесения реактива



после нанесения реактива

Рисунок 4-4. Проведение оксидазного теста:
колонии оксидазоотрицательных бактерий (цифра 1) не изменили свой цвет,
оксидазоположительные (цифра 2) стали синими

Часть III. Обнаружение каталазы у бактерий

Для постановки опыта понадобится 3% перекись водорода.

1. Отберите платиновой или пластиковой одноразовой петлёй небольшое количество биомассы изучаемого штамма бактерий и нанесите на предметное стекло.

2. Сверху нанесите 1 каплю 3% перекиси водорода.

3. Поместите стекло на предметный столик микроскопа и наблюдайте под малым увеличением. Выделение газообразного кислорода начинается через 2...5 секунд.

Лабораторная работа № 5

Обнаружение сахаролитических ферментов бактерий. «Пёстрый ряд»

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Сахаролитические ферменты бактерий, их роль в метаболизме 2. Навыки работы с Определителем бактерий Берджи	Посев в пробирки со средами Гисса	Таблицы: 1. Виды субстратного фосфорилирования у прокариот. 2. Виды брожения. 3. Список дифференциально-диагностических сред

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Разные виды микроорганизмы обладают разными наборами ферментов, что объясняется генетическими различиями как между разными видами, так и в ряде случаев, между отдельными популяциями внутри одного и того же вида. Разнообразие ферментативных процессов можно использовать для идентификации микроорганизмов. Такой подход был предложен датским учёным Сигурдом Орла-Йенсеном (рис. 5-1) в 1909 году. По предложенному методу большинство известных к тому времени родов бактерий определялось на основании биохимических признаков, хотя таксоны более высокого ранга формировались на основании морфологических признаков.

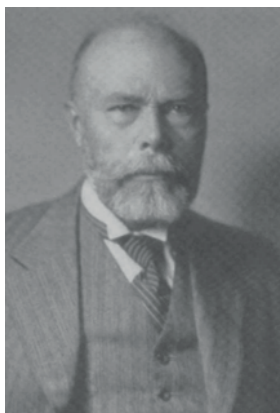


Рисунок 5-1. Сигурд Орла-Йенсен



Рисунок 5-2. Дэвид Берджи

Наибольшее развитие этот подход получил в работах американского микробиолога Дэвида Берджи (рис. 5-2) и его последователей. Их труды до начала XXI века издавались в виде двух руководств: «Справочник Берджи по бактериологической систематике» и «Определитель бактерий Берджи». Эти работы до сих пор не утратили актуальности, хотя развивающиеся молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР и секвенирование ДНК по-видимому вскоре займут лидирующее положение.

Для установления ассортимента сахаролитических ферментов изучаемую культуру засевают **уколом** в пробирки с дифференциально-диагностическими средами Гисса. В состав сред Гисса входят:

Пептон	4,8 г
NaCl	4,0 г
Агар *	3,0 г
$K_2HPO_4 \cdot 6H_2O$	0,2 г
Na_2CO_3	0,02 г
Индикатор**	0,02 г
Углевод ***	4,0 г
Вода	1000 мл

Примечания:

* – Среды Гисса могут выпускаться различными производителями для использования как в полужидком виде, так и в жидком виде. В последнем случае агар не добавляют.

** – В качестве индикаторов могут использоваться бромкрезоловый пурпурный, бромтимоловый синий или ВР (водный розовый, смесь аурина и анилинового голубого 1:1), поэтому исходный цвет среды может быть разным (см. рис. 5-3).

*** – В каждую пробирку добавляется **один из** углеводов, перечисленных в таблице 5-1:

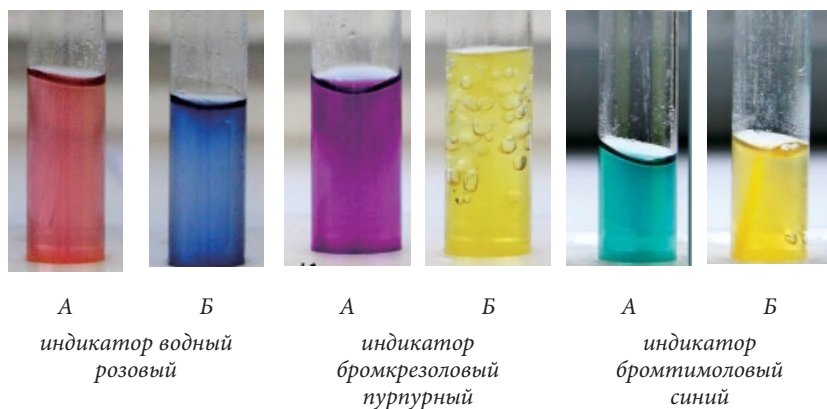
Таблица 5-1

Углеводы, используемые в средах Гисса

Пентозы	Гексозы	Дисахариды	Трисахариды	Полисахариды	Спирты	Глюкозиды
Арабиноза ксилоза рамноза	Глюкоза левулеза манноза галактоза	Мальтоза лактоза сахароза трегалоза целлобиоза мелибиоза	Раффиноза мелицитоза	Инулин декстрин крахмал гликоген	Глицерин эритрит адонит арабит маннит дульцит сорбит инозит	Салицин эскулин кониферин арбутин

Существуют понятия «**короткий пёстрый ряд**» и «**длинный пёстрый ряд**». Во многих случаях нет никакой необходимости проверять изучаемый штамм на способность бактерии усваивать весь перечень углеводов, представленных в таблице 5-1. Например, для определения биохимических свойств острых кишечных инфекций и установления родовой принадлежности используют среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом а также среды для определения протеолитических свойств – мясопептонный бульон и желатин. Это «короткий» пёстрый ряд (рис. 5-4). В других случаях, кроме указанных сред в анализ включают среды Гисса и с другими углеводами и/или аминокислотами. Такой пёстрый ряд называют «длинным».

Принцип действия сред Гисса заключается в следующем: если бактерия способна усваивать данный углевод в качестве единственного источника энергии и углерода для строительства своих собственных молекул, то выделятся кислые промежуточные продукты метаболизма и цвет индикатора изменится. Помимо кислот у некоторых бактерий выделяются также и газообразные продукты распада данного углевода. Для обнаружения выделения газа в пробирку с жидкой средой Гисса помещают так называемый поплавок (пробирку Дарема), в полужидких средах газообразование устанавливают по появлению пузырьков и разрывов в столбике среды (рис. 5-5).



*Рисунок 5-3. Среда Гисса с разными индикаторами:
А – исходный цвет среды,
Б – изменение цвета при усвоении углевода.*

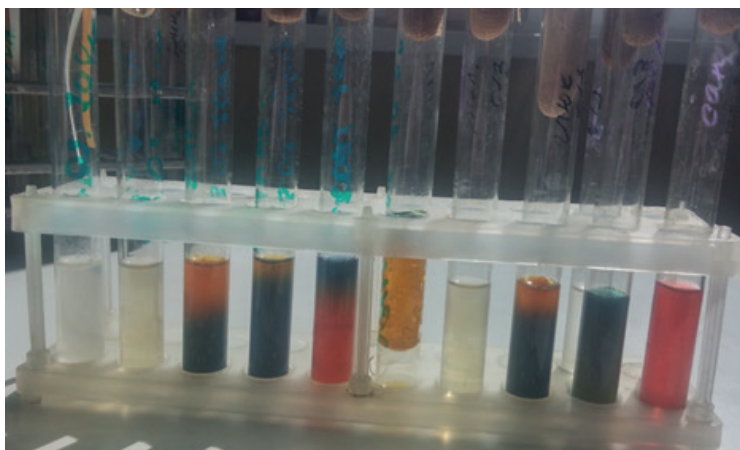
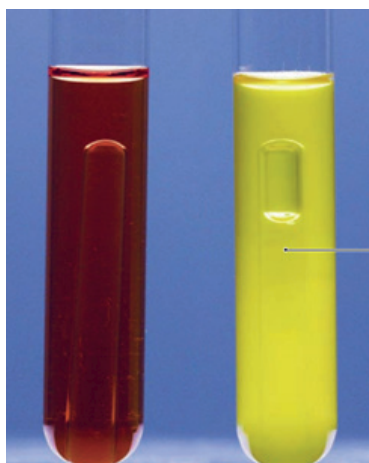


Рисунок 5-4. Короткий пёстрый ряд.
Первые две пробирки – мясопептонный бульон и желатин для определения протеолитических свойств (см. лабораторную работу №6)



А



Б

Рисунок 5-5. Газо- и кислотообразование в среде Гисса:
А – жидкая среда: в правой пробирке виден пузырьёк газа в поплавке, цвет среды изменился на жёлтый;
Б – полужидкая среда: многочисленные пузырьки газа и поднятие столбика среды, цвет изменился с зелёного на жёлтый.

Таблица 5-2

Пример различий по биохимическим свойствам для некоторых энтеробактерий

Вид бактерий	Признаки												
	Окраска по Граму	Питоворо-моксидаза	Каталаза	Индол	Сероводо-род	Проба Хью-Лейфсона	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маннит	Глицерин	Ксилоза
Escherichia coli	—	—	+	+	—								
Escherichia fergusonii	—	—	+	+	—								
Shigella dysenteriae	—	—	+	d	—								
Klebsiella pneumoniae	—	—	+	—	—								

Условные обозначения в таблице: «+» – положительный результат; «—» – отрицательный результат; «d» – 26-75% штаммов положительных; жёлтый цвет среды – углевод усваивается; жёлтый с синим среды – усвоение глюкозы с выделением кислоты и газа; зелёный цвет среды – углевод не усваивается; две пробирки в ячейке – 26-75% штаммов положительных. **Жирным** выделены углеводы «короткого» пёстрого ряда.

Обратите внимание, используя только «короткий» пёстрый ряд нельзя отличить один из представленных видов эшерихий от другого.

ХОД РАБОТЫ

1. Проведите посев чистой культуры, полученной в ходе лабораторной работы №2 на приготовленный заранее короткий пёстрый ряд
2. На следующем занятии зарегистрируйте результаты, учитывая образование кислоты и, возможно, газа
3. Пересейте чистую культуру на свежую питательную среду для дальнейших испытаний в лабораторных работах №6 и №7
3. Используя «Определитель бактерий Берджи» и данные полученные в ходе лабораторных работ №№2-4 попытайтесь провести предварительную идентификацию вашей чистой культуры

Лабораторная работа № 6

Определение протеолитических и липолитических свойств бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
1. Белковый обмен у прокариот 2. Липиды бактерий и их роль	Посев в пробирки с желатином и пептонной водой до и после посева;	1. Результаты опытов по определению протеолитических свойств 2. Результаты опытов по определению липолитических свойств

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Помимо глюкозы, микроорганизмы могут включать в катаболизм и другие соединения. В химических связях молекул белков и жиров заключено большое количество энергии. Например, одна молекула пальмитиновой (гексадекановой) жирной кислоты содержит энергии достаточно, чтобы синтезировать 129 молекул АТФ а также может быть превращена в молекулы предшественников веществ, включаемых в цикл Кребса.

Часть I. Протеолитические свойства бактерий

Патогенные микроорганизмы, в частности многие бактерии и грибы способны расщеплять белки для получения энергии и молекул, включаемых ими в свой метаболизм. Однако, происходит это преимум-

щественно тогда, когда другие источники энергии, такие как углеводы и липиды оказываются недоступными.

Молекулы белка очень крупные и обычно не могут проникнуть через цитоплазматическую мембрану, поэтому микробная клетка выделяет протеолитические ферменты в окружающую среду. Эти ферменты расщепляют белки на олигопротеины, поглощаемые клеткой. В клетке аминокислоты либо включаются в состав новых белковых молекул, либо подвергаются дезаминированию. После дезаминирования метаболиты попадают в цикл Кребса, а аминокислоты либо включаются в новые аминокислоты, либо выводятся в виде азотистых отходов, таких как **аммиак** (NH_3) или ион аммония (NH_4^+). Поскольку некоторые аминокислоты в своём составе содержат серу, то при их расщеплении может выделяться **сероводород** (H_2S).

Выделение аммиака и сероводорода – важные признаки, которые обязательно учитываются при росте бактерий на средах, содержащих белок.

Протеолитическая активность микроорганизмов обусловлена большим набором протеаз, поэтому на разных белковых средах она проявляется по-разному. Для обнаружения протеолитической активности чаще всего используют среды:

- **Желатин.** Признаком протеолитической активности будет служить разжижение желатинового столбика в пробирке (рис. 6-1, рис. 6-2).

- **Свёрнутая сыворотка.** О протеолитической активности говорит разжижение среды.

- **Молоко.** Под воздействием протеолитических ферментов бактерий молочный белок может свернуться с отделением сыворотки, либо подвергнуться дальнейшему гидролизу до растворимых продуктов (*пептонизация*) (рис. 6-3).

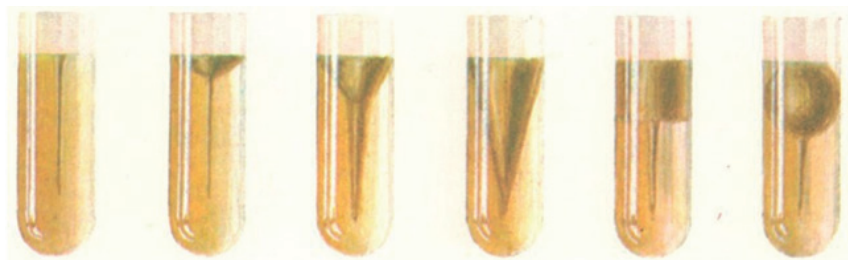


Рисунок 6-1. Разжижение желатина. Зоны протеолизированного желатина могут принимать разные формы: «воронка», «ёлочка» и т.д. Левая пробирка – контроль (отрицательный результат).

• Пептонная вода или мясопептонный бульон (МПБ). На этой среде определяют *способность бактерий расщеплять белки до продуктов глубокого распада*, что сопровождается выделением индола и/или сероводорода (рис. 6-4).



Рисунок 6-2. Разжижение желатина. При наклоне пробирок становится заметно, что в некоторых из них желатин стал жидким.

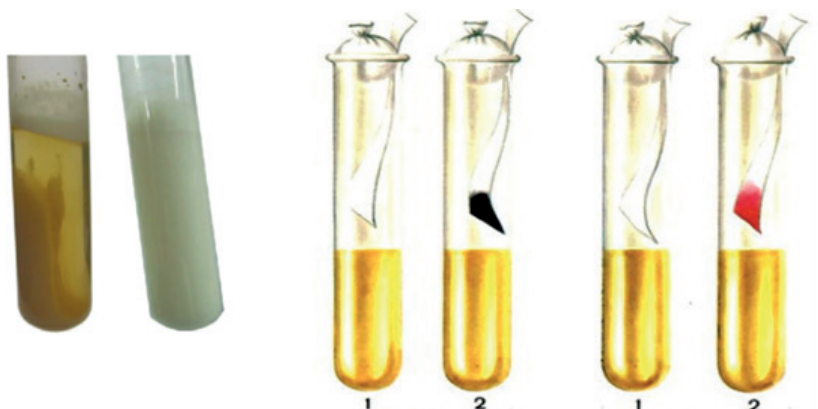


Рисунок 6-3.
Пептонизация
молока (слева).
Молоко становится
желтоватым и
полупрозрачным

А Б
Рисунок 6-4. Определение способности бактерий
расщеплять белки до продуктов глубокого распада:
А – сероводорода и Б – индола.
См. пояснения в ходе работы

Часть II. Липолитические свойства бактерий

Чаще всего липиды, которые могут быть источниками энергии для синтеза АТФ и полезных клетке метаболитов, являются жирами: они состоят из глицерина и трёх жирных кислот.

Ферменты, участвующие в расщеплении жиров – липазы производят гидролиз связей между глицерином и жирными кислотами. Затем эти компоненты подвергаются дальнейшему метаболизму: глицерин превращается в дигидроксиацетонфосфат (DHAP), который включается в гликолиз и окисляется до пирувата (рис. 6-5); жирные кислоты подвергаются так называемому бета-окислению.

Суть бета-окисления заключается в том, что ферменты многократно отщепляют пары гидрированных атомов углерода от жирной кислоты и присоединяют эти пары к молекулам кофермента А, образуя ацетил-КоА. В результате этого повторяющегося процесса вся жирная кислота превращается в молекулы ацетил-КоА, которые включаются в цикл Кребса. При бета-окислении также образуются NADH и FADH₂, которые доставляют электроны в электрон-транспортную цепь, что также приводит к образованию новых молекул АТФ (рис. 6-6).

В лабораторных условиях липолитическую активность бактерий можно определять на средах с добавлением животных или растительных жиров, однако, наибольшее распространение получили среды с до-

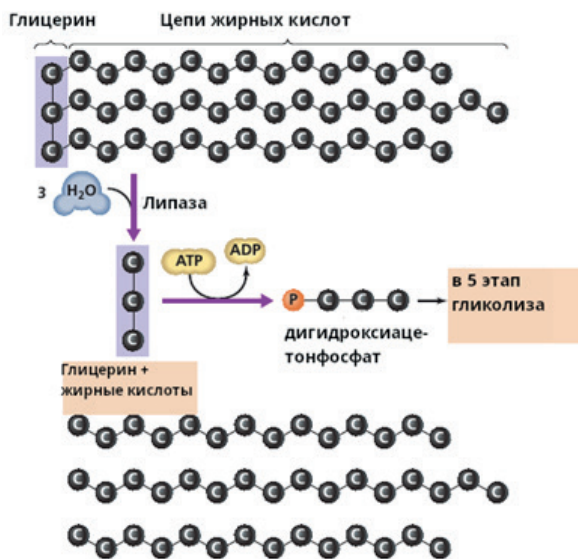


Рисунок 6-5. Первый этап гидролиза жиров

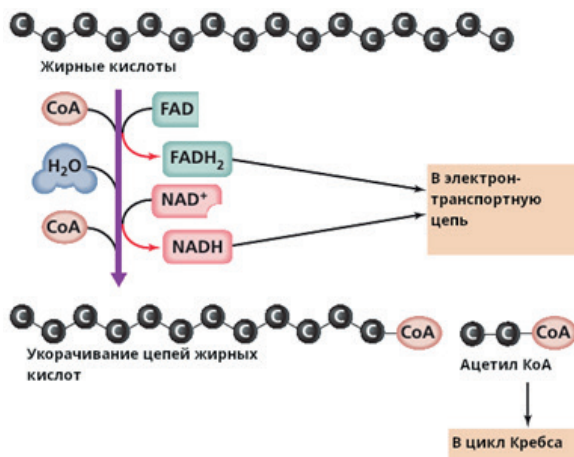


Рисунок 6-6. Бета-окисление жирных кислот

бавлением вещества **Твин-80** – поверхностно-активного синтетического соединения, широко используемого в народном хозяйстве, а также среды с **лецитином**, которое добавляется в среду либо в очищенном виде (как смесь лецитинов экстрагированных из подсолнечного или соевого масла), либо в составе яичного желтка.

Лецитиназа – один из липолитических ферментов, гидролизует лецитин в клеточных мембранах что приводит к их дестабилизации. Разрушение мембран лейкоцитов подавляет иммунный ответ организма. Этот фермент имеется у многих микроорганизмов, таких как стафилококки, клостридии, бациллы, листерии.

У золотистого стафилококка наличие лецитиназы тесно связано с продукцией основного фактора патогенности – плазмокоагулазы. Более 99% штаммов, продуцирующих лецитиназу, продуцируют и этот фермент. Поскольку лецитиназу легче и быстрее обнаружить, проведя выделение из клинического материала сразу на среду с лецитином, этой особенностью возбудителя часто пользуются для ускорения идентификации возбудителя.

ХОД РАБОТЫ

Часть I. Определение протеолитических свойств

1. Приготовьте питательные среды: 7% желатин, обезжиренное молоко, МПБ.

2. Проведите посев изучаемого штамма: в желатин – уколом, в жидкие среды – коснувшись петлёй стенки пробирки под уровнем среды

3. Между ватно-марлевой пробкой и стенкой пробирки с МПБ помещают 2 полоски фильтровальной бумаги (см. рис. 6-4). Первая полоска пропитана насыщенным раствором ацетата свинца. Если при усвоении белковых веществ будет выделяться **сероводород**, то нижняя часть полоски **почернеет**: $\text{H}_2\text{S} + \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{PbS}$ (черного цвета). Вторая полоска пропитана насыщенным раствором щавелевой кислоты. Если при усвоении белковых веществ будет выделяться **индол** то нижняя часть полоски **покраснеет**.

4. Через неделю проведите учет результатов. Перед учётом пробирку с желатином нужно выдержать 30 минут в холодильнике (!)

Разжижение желатина	Молоко	МПБ
<i>варианты реакции:</i>		
а) «+» разжижение б) «—» без изменений см. рис. 6-2	Свертывание Пептонизация Без изменений см. рис. 6-3	Характер роста: помутнение (слабое, умеренное или сильное) плёнка (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая) осадок (скудный, обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный) H₂S : «+» «—» индол : «+» «—»

Часть II. Определение липолитических свойств бактерий

1. Приготовьте питательную среду с лецитином:

Для определения лецитиназы С используются твердые и жидкие среды. Твердая среда состоит из следующих компонентов:

Пептон	20,0 г
Декстроза	1,0 г
Na_2HPO_4	2,5 г
NaCl	1,0 г
MgSO_4	0,05 г
Агар	12,5 г
Дистиллированная вода	500,0 мл

Перечисленные ингредиенты растворяют в дистиллированной воде устанавливают pH 7,2...7,4 и автоклавируют при 121 °C 15 минут.

2. Затем среду охлаждают до 50 °C и добавляют яичный желток. Яйцо моют с мылом и его поверхность дезинфицируют спиртом. В асептических условиях отделяют белок, а желток добавляют в приготовленную среду.

3. Затем среду разливают по чашкам Петри, охлаждают до затвердения и засевают штрихом исследуемой культурой.

4. Чашки инкубируют при 28° и 35 °C 2...3 дня, затем осматривают. **Образование непрозрачных зон** накопления продуктов распада лецитина вокруг колоний означает положительный результат (рис. 6-7).

Некоторые исследователи рекомендуют использовать человеческую сыворотку как источник лецитина.

В специальной литературе тест на лецитиназу также иногда называется **Наглер-реакция**, названной в честь автора (Nagler), который описал явление опалесценции человеческой сыворотки под действием токсина (лецитиназы) *Clostridium perfringens*.

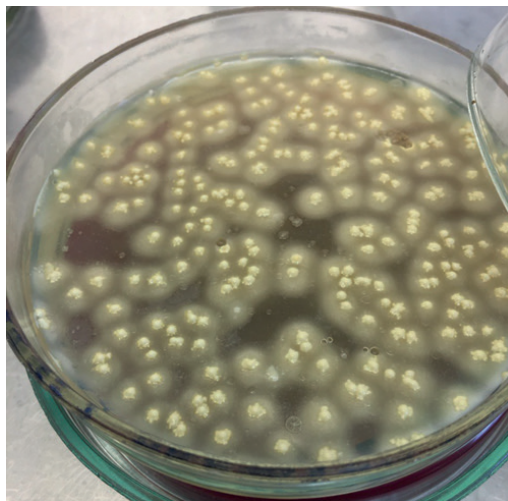


Рисунок 6-7. Образование опалесцирующих мутных зон вокруг колоний золотистого стафилококка свидетельствует о наличии лецитиназы у данного штамма и, следовательно, о его патогенности

Лабораторная работа № 7

Дополнительные биохимические тесты для идентификации бактерий

Программа занятия	Содержание протокола	Записи в рабочую тетрадь
Изучение дополнительных биохимических тестов для идентификации бактерий, их интерпретация		Результаты проведённых тестов

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В данной лабораторной работе описаны физиологические тесты, характеризующие разные метаболические пути и системы.

Устойчивость к бацитрацину.

Бацитрацин – антибиотик полипептидной природы, вырабатываемый бактериями *Bacillus subtilis*. Он подавляет синтез пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Тест предназначен для быстрой идентификации *Streptococcus pyogenes* от других бета-гемолитических стрептококков: *Streptococcus pyogenes* чувствителен даже к низким концентрациям этого антибиотика, другие стрептококки – нет.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Приготовьте чашку Петри с кровяным агаром. Для этого в колбу с расплавленным и охлаждённым мясопептонным агаром добавьте 5% дефибринированной бараньей или кроличьей крови.

2. Сделайте посев изучаемого штамма штрихом или по Дригальскому

3. После посева сразу же стерильным пинцетом возьмите диск, пропитанный бацитрацином и уложите его на поверхность агара, слегка придавив, для лучшего контакта диска и агара

4. Через 72 часа просмотрите посев: если изучаемый штамм является *Streptococcus pyogenes*, то вокруг диска будет заметна зона, свободная от роста бактерий (рис. 7-1).

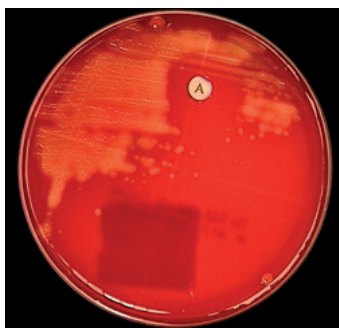


Рисунок 7-1. Зона задержки роста культуры *Streptococcus pyogenes* вокруг диска с бацитрацином

Лизис солями желчных кислот (дезоксихолатом натрия)

Этот тест предназначен для быстрой дифференциации пневмококка (*Streptococcus pneumoniae*) от пиогенных стрептококков: культура пневмококка лизируется желчью, тогда как все другие альфа-гемолитические стрептококки к желчи устойчивы.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Возьмите чашку Петри с суточной культурой изучаемого штамма (штаммов) и капните каплю 10% реагента рядом с колонией (колониями)
2. Наклоните чашку, чтобы капля накрыла колонию
3. Инкубируйте чашку аэробно в вертикальном положении при температуре от 35°C до 37°C и периодически проверяйте в течение 30 минут.
4. Наблюдайте за распадом или растворением колонии (рис. 7-2).



Рисунок 7-2. Растворение колоний *Streptococcus pneumoniae* под воздействием желчи

САМР - тест

Тест предназначен для быстрой идентификации *Streptococcus agalactiae* в клинической лаборатории. Результат появляется через 18 часов инкубации, прост в исполнении, и редко дает ложноположительные результаты с другими стрептококками.

Суть теста заключается в усилении гемолитической активности штаммов *Staphylococcus aureus*, продуцирующих бета-гемолизин, внеклеточным белком (фактором САМР), продуцируемым стрептококками группы В.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Возьмите чашку Петри с кровяным агаром и проведите посев бета-гемолитического штамма *Staphylococcus aureus* в виде линии по центру чашки.

2. Посейте изучаемые штаммы в виде линий, перпендикулярных полосе стафилококка. Линии не должны соприкасаться (!) (рис. 7-3).

3. Инкубируйте чашку 18...24 часа при температуре +35...+38 °С.

4. Просмотрите чашку. Если наблюдается усиление бета-гемолиза стафилококка в зоне приближения роста двух штаммов в виде стрелки, то перед вами *Streptococcus agalactiae*.

Определение плазмокоагулазы

Этот тест позволяет дифференцировать *Staphylococcus aureus* (положителен по этому признаку) от других стафилококков. Плазмокоагулаза считается основным фактором вирулентности золотистого стафилококка. Этот фермент превращает растворимый фибриноген в плазме в нерастворимый фибрин, а фибрин покрывает бактериальные клетки, защищая их от опсонизации и фагоцитоза.

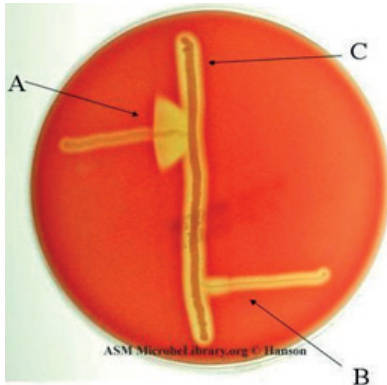


Рисунок 7-3. Результаты САМР теста: стреловидный гемолиз в зоне близкого роста *Streptococcus agalactiae* (А) и *Staphylococcus aureus* (С). *Streptococcus pyogenes* (В) не выделяет САМР-фактор и, соответственно, не усиливает гемолитическую активность стафилококка

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Разведите плазму крови кролика в стерильном изотоническом растворе в соотношении 1:6. Полученную смесь разлейте по 1 мл в небольшие пробирки.

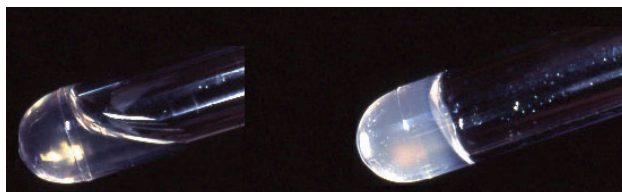
2. Внесите биомассу изучаемого штамма в пробирку в количестве, достаточном для получения густой суспензии.

3. Поместите пробирку на водяную баню с температурой +35 °С на 4 часа. После инкубации проверьте образование сгустка плазмы наклонив пробирку (рис. 7-4).

4. Для окончательного ответа оставьте пробирку на ночь при комнатной температуре.

5. Положительной реакцией считается образование сгустка любого размера.

Примечание: испытуемый штамм должен быть выращен на МПА или кровяном агаре. Солевые среды не подходят. Цитратная кровь не подходит для этого теста.



А

Б

Рисунок 7-4. Тест на плазмокоагулазу:

А – отрицательный результат; Б – положительный результат

Усвоение солей лимонной кислоты на среде Симмонса

Определение способности микроорганизмов расти на средах, с единственным источником углерода в виде цитратов и единственным источником азота в виде дигидрофосфата аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) диагностически важно для многих бактерий, особенно для дифференциации видов семейства *Enterobacteriaceae*. Обычно он проводится как часть группового теста IMViC (индол (см. лабораторную работу №6), проба с метиловым красным, реакция Фогеса-Проскауэра (см. ниже в тексте) и цитрат).

Суть метода заключается в том, что когда органическая кислота, такая как цитрат, используется в качестве источника углерода и энергии (в цикле Кребса), образуются щелочные карбонаты и бикарбонаты, повышающие pH среды, что приводит к изменению цвета индикатора.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Приготовьте среду Симмонса следуя указаниям на упаковке фирмы-производителя
2. Разлейте среду в пробирки на скошенный агар
3. Посейте изучаемый штамм на среду и поместите в термостат
4. Инкубируйте в термостате при 37 °С в течение 24 часов
5. Просмотрите посев. Изменение цвета среды с зелёного на синий указывает на усвоение цитрата (рис. 7-5).

Проба с метиловым красным (определение образования кислоты на средах с глюкозой; MR тест)

Тест проводится на содержащих глюкозу средах, в которых могут расти бактерии. Суть теста заключается в способности бактерий образовывать кислоту до pH 4,2 и ниже, усваивая глюкозу. Метиловый красный используется в качестве индикатора. Его цвет изменяется от светло-красного до желтого при уровне pH между 4,2 и 6,3 соответственно. Наиболее часто используется жидкая фосфатно-пептонная среда:



Рисунок 7-5. Усвоение цитрата в среде Симмонса (правая пробирка)

Пептон	5,0 г
K_2HPO_4	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Приготовление раствора индикатора метиловый красный:

Растворяют 0,04 г индикатора в 40 мл 96 % спирта и добавляют дистиллированной воды до 1000 мл.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Среду засевают 24-часовой культурой и инкубируют при 30°C или 37°C 2-7 дней.

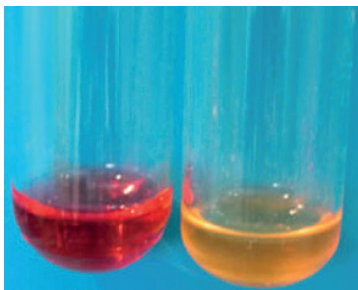


Рисунок 7-6. Проба с метиловым красным: слева положительный результат – индикатор стал красного цвета

2. Стерильной пипеткой или шприцем отбирают 1-2 мл культуры и переносят в чистую пробирку. Оставшаяся часть культуры будет использована для проведения реакции Фогеса-Проскауэра

3. Добавляют в пробирку 2 капли раствора индикатора. Красный цвет указывает на образование кислоты, оранжевый регистрируется как сомнительно положительный результат, желтый цвет индикатора - отрицательный результат (рис. 7-6).

Реакция Фогеса-Проскауэра (образование ацетона, VP-тест)

Тест Фогеса-Проскауэра (VP) позволяет установить, производит ли организм ацетилметилкарбинол (ацетон) в результате усвоения глюкозы. Ключевым соединением при ферментативной расщеплении глюкозы является пируват, который далее подвергается дальнейшему метаболизму различными способами. Один из таких катаболических путей приводит к образованию ацетона (ацетилметилкарбинола), конечного продукта с нейтральной реакцией.

Если бактерий образует в процессе жизнедеятельности ацетилметилкарбинол, то его можно обнаружить при помощи альфа-нафтола и крепкой щелочи (40% КОН). При добавлении этих соединений в среду в присутствии кислорода ацетон превращается в диацетил. Диацетил и гуанидинсодержащие соединения, обнаруженные в пептоне, затем конденсируются, образуя розовато-красный полимер.

Этот тест важен для таких бактерий как *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Hafnia* spp., *Serratia* spp., которые вырабатывают ацетон как главный конечный продукт метаболизма глюкозы и образуют меньшие количества смешанных кислот.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Возьмите оставшуюся при проведении пробы с метиловым красным культуру.

2. Добавьте в пробирку сначала 0,6 мл 5% α -нафтола, а затем 0,2 мл 40% КОН.

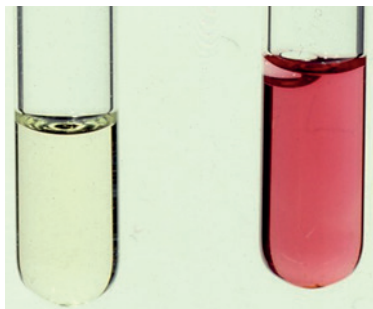


Рисунок 7-7. Реакция Фогеса-Проскауэра:
справа – положительный результат

3. Осторожно встряхните пробирку, чтобы среда подверглась воздействию атмосферного кислорода, и оставьте пробирку в покое на 10...15 минут.

4. Появление розово-красного окрашивания регистрируется как положительный результат (рис. 7-7).

Восстановление нитрата

Этот тест используется для дифференциации видов семейства *Enterobacteriaceae* на основании их способности вырабатывать фермент нитратредуктазу, который гидролизует нитрат (NO_3^-) до нитрита (NO_2^-), который затем может снова расщепляться до различных азот-содержащих продуктов, таких как оксид азота, закись азота и аммиак (NH_3).

Этот тест помогает дифференцировать виды микобактерий, коринебактерий, отличать *Neisseria* spp. от *Moraxella* spp. и *Kingella* spp.

ХОД РАБОТЫ (демонстрационный опыт)

1. Проведите посев исследуемой культуры на нитратный бульон (мясопептонный бульон с добавлением 0,1% нитрата калия).

2. Через 24 или 48 часов инкубации добавьте в пробирку реактив Грисса. При образовании бактериями нитрита среда окрашивается в красный цвет.

3. Если красный цвет не наблюдается, то это может произойти по следующим причинам:

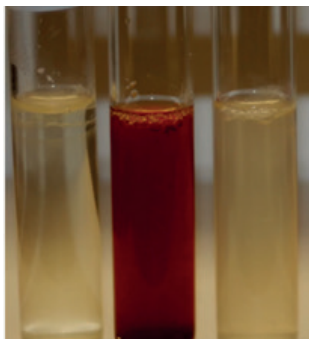


Рисунок 7-8. Восстановление нитрата до нитрита: в центре – положительный результат.

- Восстановления нитрата до нитрита не произошло

- Восстановления нитрата до нитрита произошло, но нитрит подвергся дальнейшему превращению, например до NO , N_2O или N_2 .

4. Добавьте в пробирку с предположительно отрицательным результатом немного металлического цинка. Цинк катализирует восстановление нитрата до нитрита. Если после добавления цинка появляется красное окрашивание, то это *истинно отрицательный результат теста* (нитрат оставался в бульоне и был восстановлен цинком). Отсутствие изме-

нения цвета означает, что нитрата в бульоне не осталось. Таким образом, отсутствие изменения цвета на данном этапе является *положительным* результатом.

Определение гемолитической активности

Определение гемолиза проводится на мясопептонных средах с добавлением крови.

Предпочтительно использовать кровь кроликов. Следует помнить что цитратная кровь не подходит для этого теста.

ХОД РАБОТЫ

(демонстрационный опыт)

1. Приготовьте кровяной агар: к 250 мл расплавленного и охлаждённого до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ мясопептонного агара асептически добавьте 12,5 мл (5%) стерильной дефибринированной кроличьей или бараньей крови. Тщательно перемешайте.

2. Разлейте полученную среду в чашки Петри и дайте ей застыть.

3. Проведите посев изучаемой культуры бляшкой или истощающим штрихом так, чтобы получились отдельно растущие колонии.

4. Поместите посевы в термостат при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 24 или 48 часов.

5. Просмотрите посевы и определите тип гемолиза (см. табл. 3.1)

Использованная литература

1. Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae* в России в 1999-2005 гг.: результаты многоцентровых проспективных исследований ПеГАС-I и ПеГАС-II // К., 2006.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках: учебное пособие. – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464с.
4. Микробиология / Под ред. Ф. К. Черкес. - М.: Медицина, 1986. - 512 с., ил. – URL: <http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000015/st023.shtml> (дата обращения 15.08.2024).
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – № 4. – Т. 6. – С. 306-359.
6. Определитель бактерий Берджи /Под. ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса.-М.:Мир.-1997. –Т.1.- 430 с.
7. Руководство по медицинской микробиологии. Под ред.: А.С. Лабинская, Н.Н.Костюкова, С.М.Иванова.- Москва: БИНОМ, - 2012.
8. Сидоренко С.В. Какие антибиотики нужны для лечения респираторных инфекций? / Материалы Конгресса «Ліки та життя», К., 15-16 февраля, 2005.
9. Среда Гисса. URL: <https://ecolab-d.ru/biotexnovacziya/test-1/sredyigissa.html> (дата обращения 15.08.2024).
10. Чубенко Г.И. Методы идентификации бактерий. Методическое пособие для самоподготовки студентов. URL: https://www.amursma.ru/upload/iblock/7b1/Metody_identifikacii_bakterij_Metodicheskoe_posobie_dlya_samopodgotovki_studentov.pdf (дата обращения 15.08.2024).
11. Шабан Ж. Г.; Слизень В. В.; Канашкова Т. А.; Крылов И. А. Методы исследования в микробиологии Учебно-методическое пособие, Минск –БГМУ. – 2010.
12. Шуб Г.М., Сумовская А.Е., Зырянов В.В. Автоматизированные методы индикации и идентификации микроорганизмов в экспресс-диагностике инфекций// Клиническая лабораторная диагностика -2000., № 5, С. 46-48.
13. Bauman, R. W.; Primm, T. P.; Siegesmund, A. M.; Cosby, C. D.; Montgomery, J. E. Microbiology: With Diseases by Body System; Pearson Education, Inc., 2018.

14. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition. (2016). In Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition. American Society of Microbiology. URL: <https://doi.org/10.1128/9781555818814> (дата обращения 15.08.2024).
15. Conn, H. J., & Breed, R. S. (1919). The Use of the Nitrate-Reduction Test in Characterizing Bacteria. *Journal of bacteriology*, 4(3), 267–290. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.4.3.267-290.1919> (дата обращения 15.08.2024).
16. El-Naggar, Noura & El-Shweihy, Nancy & El-Ewasy, Sara. (2016). Identification and statistical optimization of fermentation conditions for a newly isolated extracellular cholesterol oxidase-producing *Streptomyces cavourensis* strain NEAE-42. *BMC microbiology*. URL: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0830-4> (дата обращения 15.08.2024).
17. Felmingham D., Gruneberg R.N. & the Alexander Project Group. The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 191-203.
18. Fleming, W., & Fierer, J. (1978). Nitrate reduction: new method for testing the antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 13(5), 791–795. URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.13.5.791> (дата обращения 15.08.2024).
19. Jacobs M.R., Felmingham D., Appelbaum P.C. et al. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infections to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 229-246.
20. Katz, B. E., & Fisher, A. A. (1987). Bacitracin: a unique topical antibiotic sensitizer. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 17(6), 1016–1024. URL: [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(87\)70292-8](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(87)70292-8) (дата обращения 15.08.2024).
21. Katz, D. S. (2010, November 11). Coagulase Test Protocol. URL: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3220> (дата обращения 15.08.2024).
22. *Staphylococcus Argenteus: Another Coagulase Positive Staphylococcus*. ASM.Org. Retrieved June 4, 2021, URL: <https://asm.org/Podcasts/Editors-in-Conversation/Episodes/Staphylococcus-Argenteus-Another-Coagulase-Positiv> (дата обращения 15.08.2024).
23. Murray, P. R., Wold, A. D., Hall, M. M., & Washington, J. A., 2nd (1976). Bacitracin differentiation for presumptive identification of group A beta-hemolytic streptococci: comparison of primary and purified plate testing. *The Journal of pediatrics*, 89(4), 576–579. URL: [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(76\)80389-7](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(76)80389-7) (дата обращения 15.08.2024).
24. Sridhar Rao. Amino acid metabolism tests. URL: https://www.microrao.com/micronotes/pg/amino_acids.pdf (дата обращения 15.08.2024).