

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО

Кафедра ботаники и экологии

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

ЧАСТЬ 2:

Физиология и генетика микроорганизмов

Методические рекомендации

Тирасполь, 2021

УДК 579(07)(075)
ББК 28.4 р3я 73
М 54

Составители:

Е.Б. Бушева, ст. преп.
Т.И. Богатая, преп.

Рецензенты:

В.В. Власов, канд. биол. наук, доцент
М.В. Капитальчук, канд. биол. наук, доцент

Лабораторные работы по микробиологии. Ч. 2. Физиология и генетика микроорганизмов: методические рекомендации / сост. Е.Б. Бушева, Т.И. Богатая. – Тирасполь, 2021. – 87 с.

Содержат материал для проведения лабораторных занятий по дисциплине: «Микробиология и вирусология». Лабораторные занятия подобраны и методически распределены в соответствии с программой подготовки биологов, включают описательную часть, в которой кратко изложены особенности применяемых методов, и рекомендации к выполнению практических заданий по указанной теме. Включают 5 лабораторных занятий, связанных с изучением физиологии и генетики микроорганизмов, в которых рассматриваются методы микробиологических исследований. Дано описание способов выделения микроорганизмов в чистую культуру, методов изучения физиологических и биохимических свойств бактерий для их идентификации, определения титра бактериофагов и расчета генетических рекомбинаций.

Рассчитаны на студентов биологических специальностей учебных заведений, а также могут быть полезными для преподавателей дисциплины «Микробиология».

УДК 579(07)(075)
ББК 28.4 р3я 73

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

ВВЕДЕНИЕ

Методические рекомендации составлены в соответствии с учебным планом по микробиологии и позволяют осуществить выполнение всех видов лабораторных работ, предусмотренных учебной программой по разделу «Физиология и генетика микроорганизмов» данного курса. Включает описание пяти лабораторных занятий по темам: «Культивирование бактерий. Методы посева», «Культуральные свойства бактерий», «Биохимические свойства бактерий», «Идентификация бактериальной культуры. Культивирование вирусов», «Методы изучения рекомбинации у бактерий».

Изучение каждой темы начинается с теоретической части, в которую включены тезисы лекций, а также вспомогательные материалы в виде пояснительных таблиц и схем для записи в рабочую тетрадь. Далее следуют тесты по текущей работе и вопросы для самоподготовки к следующему занятию. Затем идет практическая часть, содержащая информацию о проведении соответствующей лабораторной работы. Каждая лабораторная работа начинается с цели лабораторного занятия, за которой следуют описательная часть, оснащение и сам ход выполняемой работы. Затем дается программа лабораторного занятия, включающая домашнее задание для подготовки, а именно, задание для самостоятельной работы по заполнению рабочей тетради и перечень вопросов для теоретической подготовки. Следом идет рабочее задание, содержащее описание того, что необходимо выполнить непосредственно на лабораторном занятии, и пояснения к тому, что должно содержаться в альбоме. Также прилагаются рисунки и образцы таблиц как пример заполнения альбома.

Теоретический материал дает возможность закрепить и конкретизировать знания студентов о размножении, росте и развитии прокариот, культивировании бактерий, их культуральных и биохимических свойствах, специфике физиологии вирусов и генетики микроорганизмов. Практическая часть работы обеспечивает

получение определенных навыков выполнения микробиологических исследований, в частности, посевов суспензии бактерий на питательные среды различными методами, проведения идентификации бактериальной культуры с использованием определителей, а также расчета титра бактериофагов и частоты генетических рекомбинаций.

Представленная информация также может быть полезна для учителей средних школ, как методический материал для более углубленного изучения предмета биологии или проведения факультативных занятий.

ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

ТЕМА 1. РАЗМНОЖЕНИЕ И РОСТ ПРОКАРИОТ

Вопросы для самоподготовки к занятию № 1.

«Культивирование бактерий. Методы посева»

1. Виды размножения прокариот.
2. Особенности репликации наследственного материала у прокариот.
3. Принципы и методы культивирования бактерий.
4. Понятие о стерилизации, способы стерилизации.
5. Типы питательных сред по составу и консистенции
6. Особенности культивирования анаэробов
7. Принципы выделения и идентификации чистой культуры аэробов и анаэробов.
8. Виды бактериальных культур

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Виды размножения бактерий.

Увеличение числа клеток в популяции микроорганизмов обозначают термином «размножение». Оно характеризуется временем генерации (интервал времени, за который число клеток удваивается) и таким понятием, как концентрация бактерий (число клеток в 1 мл).

В отличие от митотического цикла деления у эукариотов размножение большинства прокариотов (бактерий) идет путем равновеликого бинарного деления.

Некоторые бактерии размножаются неравновеликим бинарным делением или почкованием. Для одной группы одноклеточных цианобактерий описано множественное деление (ряд быстрых последовательных бинарных делений, приводящий к образованию от 4 до 1024 новых клеток). Есть также такие способы деления, как фрагментация нитей или размножение обрывками трихомов. У не-

которых актиномицетов (стрептомицетов) происходит размножение путем спорообразования.

Если размножение происходит простым делением, то в середине материнской бактерии, на стенке клетки появляется перегородка, растущая с периферии к центру или наоборот. Постепенное смыкание перегородки обуславливает продольное или поперечное разъединение сформировавшихся двух равноценных дочерних клеток. Расположение перегородок делящихся клеток говорит о характере дальнейшей связи молодых особей между собой, что учитывается при определении видовой принадлежности кокковых бактерий.

Перегородки у цилиндрических бактерий часто располагаются перпендикулярно продольной оси материнской клетки, в результате деления образуются цепочки клеток, составляющие стрептобактерии или стрептобациллы. Размножение бактерий возможно и путем отпочкования от материнской клетки дочерних особей.

При делении большинство грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий синтезируют поперечную перегородку от периферии к центру при участии мезосом. Грамотрицательные бактерии делятся путём перетяжки: на месте деления обнаруживается постепенно увеличивающееся искривление ЦПМ и клеточной стенки внутрь.

При почковании на одном из полюсов материнской клетки формируется, растёт почка и отделяется перегородкой, а материнская клетка проявляет признаки старения и обычно не может дать более 4 дочерних.

Размножению предшествуют рост и изменения внутреннего содержимого клетки – перегруппировка наследственного материала, цитоплазмы, включений и вакуолей. Всегда происходит репликация кольцевой ДНК, которая осуществляется одним репликоном по полуконсервативному методу. Расхождение отреплицировавшихся молекул ДНК происходит за счет роста ЦПМ.

Под индивидуальным ростом бактерий понимают увеличение массы клеток без изменения их числа в популяции как результат скоординированного воспроизведения всех клеточных компонентов и структур. В результате индивидуального роста бактериальная клетка увеличивается в размере, а затем, достигнув зрелости и свойственной данному виду величины, она начинает размножаться.

Характер роста и размножения микробов зависит от условий их существования. При благоприятных условиях у большинства прокариот размножение происходит чрезвычайно быстро, примерно через каждые 20-30 минут наступает новое деление клеток.

2. Развитие бактериальной популяции.

Для микробиологической диагностики, изучения микроорганизмов и в биотехнологических целях микроорганизмы культивируют на искусственных питательных средах.

При изучении процесса размножения бактерий необходимо учитывать, что бактерии всегда существуют в виде более или менее многочисленных популяций, и развитие бактериальной популяции в жидкой питательной среде можно рассматривать как замкнутую систему.

В этом процессе выделяют основные фазы:

- 1-я – начальная, или лаг-фаза; она включает в себя: а) исходную стационарную, которая характеризуется адаптацией клеток к питательной среде, размножения бактерий еще нет и б) задержки размножения, которая характеризуется началом интенсивного роста клеток, но скорость их деления остается невысокой;

- 2-я – логарифмическая, или лог-фаза, или экспоненциальная фаза, – характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и увеличением числа клеток в популяции в геометрической прогрессии;

- 3-я – стационарная фаза максимума – наступает тогда, когда число клеток в популяции перестает увеличиваться. Это связано с тем, что наступает равновесие между числом вновь образующихся и гибнущих клеток. Число живых бактериальных клеток в популяции на единицу объема питательной среды в стационарной фазе обозначается как М-концентрация. Этот показатель является характерным признаком для каждого вида бактерий;

- 4-я – фаза отмирания (логарифмической гибели) – характеризуется преобладанием в популяции числа погибших клеток и прогрессивным снижением числа жизнеспособных клеток популяции. Оставшиеся в популяции клетки переходят в состояние биологического покоя, например, образуют эндоспоры.

Прекращение роста численности (размножения) популяции микро-организмов наступает в связи с истощением питательной среды и/или накоплением в ней продуктов метаболизма микробных клеток.

3. Культивирование бактерий и питательные среды.

Бактерий можно выращивать в искусственных условиях – культивировать. Культивирование является основным методом изучения физиологии, биохимии и генетики бактерий.

Оно осуществляется в специальной лабораторной посуде (чашки Петри, пробирки, колбы и проч.) с обязательным строгим соблюдением правил стерильности. Для культивирования применяются питательные среды (кроме облигатных внутриклеточных паразитов), выбор которых зависит от целей исследования и особенностей биологии изучаемого вида.

Требования к питательным средам и условиям культивирования:

Среды должны создавать оптимальные (наилучшие) условия для жизнедеятельности микробов.

Среды должны соответствовать следующим условиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органогенов и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред (осмотическое давление, pH и др.). При культивировании ряда микроорганизмов в среды вносят факторы роста – витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов – pH, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили pH, среды должны обладать буферностью, т.е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5% раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, pH и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

6) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других – низкий. Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы – при RH_2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

8) желательно, чтобы среды были прозрачными – удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

Для культивирования бактерий также необходимо создать подходящие условия аэрации. Анаэробные бактерии выращивают в специальных приборах анаэростах, в которых воздух заменяется на газовую смесь, не содержащую кислорода. Либо добавляют в питательную среду редуцирующие вещества, удаляют воздух кипячением и покрывают среду вазелиновым маслом для предотвращения диффузии кислорода из воздуха.

После посева бактерии помещаются в термостат, поддерживающий оптимальную для них температуру и инкубируют необходимое время.

4. Классификация питательных сред.

Питательные среды являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Потребность в питательных веществах и свойствах сре-

ды у разных видов микроорганизмов неодинакова. Это исключает возможность создания универсальной среды. Кроме того, на выбор той или иной среды влияют цели исследования. Поэтому разработана их классификация.

В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки.

1. Исходные компоненты. По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

2. Консистенция (степень плотности). Среда бывает жидкая, плотная и полужидкая. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких веществ, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин. Агар-агар – полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Он не является для микроорганизмов питательным веществом и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при 80–100 °С, застывает при 40–45 °С.

Желатин – белок животного происхождения. При 25–30 °С желатиновые среды плавятся, поэтому культуры на них обычно выращивают при комнатной температуре. Плотность этих сред при рН ниже 6,0 и выше 7,0 уменьшается, и они плохо застывают. Некоторые микроорганизмы используют желатин как питательное вещество – при их росте среда разжижается.

Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.

3. Состав. Среда делится на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. Назначение: а) универсальные (общие) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов. Это вышеупомянутые МПА, МПБ, пептонная вода; б) специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах; в) элективные (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов; г) дифференциально-диагностические среды позволяют отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной активности; д) селективные используются для дифференциации прототрофов от ауксотрофов; е) консервирующие среды предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; в них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов.

5. Виды бактериальных культур.

В зависимости от способа культивирования бактерий можно получать те или иные виды бактериальных культур даже в промышленном масштабе.

Если при выращивании бактерий не происходит замены питательной среды, то происходит размножение и накопление бактерий согласно этапам развития бактериальной популяции. В этом случае выход бактериальной массы не очень большой. Культуры такого вида называются периодическими, а способ их получения – стационарный или глубинный. В последнем случае при культивировании через питательную среду пропускают поток стерильного воздуха и перемешивают. Это увеличивает выход бактериальной массы.

Удаляя продукты метаболизма и/или заменяя питательную среду, можно получать непрерывные культуры. Такой процесс выращивания микроорганизмов называется проточным культивированием. Рост в непрерывной культуре позволяет получать большие массы бактерий в специальных устройствах (хемостатах и турбидистатах). Он используется при производстве вакцин, а также в биотехнологии для получения различных биологически активных веществ, продуцируемых микроорганизмами.

Для изучения метаболических процессов на протяжении цикла клеточного деления возможно также использование синхронных культур – таких культур бактерий, все члены популяции которых находятся в одной фазе цикла. Это достигается с помощью специальных методов культивирования.

Однако через несколько одновременных делений синхронизированная клеточная суспензия постепенно снова переходит к асинхронному делению, так что число клеток увеличивается в дальнейшем уже не ступенчато, а непрерывно.

При культивировании на плотных питательных средах бактерии образуют колонии – видимое невооруженным глазом скопление бактерий одного вида, являющееся чаще всего потомством одной клетки. Колонии хорошо заметны невооруженным глазом; их величина колеблется в среднем в пределах от 0,1 до 5 мм. Характер колоний – один из таксономических признаков бактерий. По величине, форме, цвету и другим особенностям можно судить о виде микробов, а по числу выросших колоний примерно определять первоначальное количество микробов, попавших на питательную среду. Этим пользуются для подсчета микробов в воде, воздухе, молоке и других средах.

На жидких питательных средах бактерии могут расти в виде пленки на поверхности (аэробы), равномерной взвеси с помутнением среды (факультативные анаэробы) и выпадением на дно пробирки осадка (анаэробы).

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 1. Способы размножения прокариот.

Способ размножения	Характеристика	Группа прокариот
Простое бинарное деление	Равновеликое деление на две части; включает: а) удвоение нуклеоида (репликация ДНК); б) пространственное расхождение нуклеоидов за счет роста ЦПМ; в) деление клеточного тела у Гр+ – перегородкой без изменения диаметра клетки, у Гр– – перетяжкой с уменьшением диаметра клетки, у цианобактерий – путем образования кольцевидного выроста в центре клетки.	Большинство одноклеточных прокариот

Способ размножения	Характеристика	Группа прокариот
Почкование	Неравновеликое деление на две части, включает: а) удвоение нуклеоида (репликация ДНК); б) формирование выпячивания (почки) на одном из концов материнской клетки, куда переходит один из нуклеоидов; в) отделение и рост почки, старение материнской клетки.	Почкующиеся стебельковые и простекобактерии, некоторые микоплазмы и цианобактерии
Фрагментация или сегментация нитей	Распадение нитевидной формы на множество частей палочковидной или кокковидной формы, которому предшествует многократное удвоение нуклеоида.	Большинство актиномицетов
Спорообразование (формирование экзоспор)	Деление особой спорулирующей гифы (спороносца) перегородками на участки, покрытые дополнительными оболочками и последовательно отделяющиеся от материнской гифы.	Некоторые актиномицеты (стрептомицеты)
Множественное деление	Ряд быстрых последовательных бинарных делений внутри дополнительного фибриллярного слоя материнской клеточной стенки с образованием мелких клеток – беоцитов с последующим их освобождением путем разрыва материнской клеточной стенки.	Некоторые одноклеточные цианобактерии
Размножение обрывками трихомов или гормогониями	Происходит распад материнского трихома на короткие (из нескольких клеток) фрагменты, в которых происходит последовательное бинарное деление, приводящие к удлинению нитевидной формы и формированию взрослых особей.	Некоторые нитевидные цианобактерии

Таблица 2. Классификация питательных сред по консистенции

Вид среды	Состав	Примеры использования
Плотная	питательный бульон с 2-3 % 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
Жидкая	питательный бульон, отвары, настои	Накопление чистой культуры, изучение биохимических признаков, изучение культуральных свойств

Таблица 3. Классификация питательных сред по назначению

Виды пит. сред	Назначение	Примеры
Универсальные (основные)	Для культивирования нетребовательных микроорганизмов	Мясо-пептонный бульон (МПБ) Мясо-пептонный 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	Среды: Эндо, Левина, Плоскирева, Висмут-сульфитагар, Гисса, Ресселя
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 Плоскарева, 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

Таблица 4. Классификация бактериальных культур

Вид культуры	Способ получения (культивирования)	Характеристика способа культивирования
Периодическая	Стационарный	В жидкой питательной среде без ее обновления и отведения продуктов метаболизма (малый выход культуры)
	Глубинный	В жидкой питательной среде без ее обновления, но с перемешиванием и продуванием воздуха (большой выход культуры из-за лучшей аэрации)
Непрерывная	Проточный	В жидкой питательной среде с постоянным подведением новой среды и отведением излишков бактерий и продуктов метаболизма (наибольший выход культуры)

Таблица 5. Виды стерилизации

Вид стерилизации		Аппаратура	Режим стерилизации	Стерилизуемые объекты	Полнота стерилизации
Физическая стерилизация	Прокаливание	Пламя	До покраснения металла	Бактериологические петли, шпатели	Полная, кратковременная
	Кипячение	Стерилизатор	100оС, 1 час	Шприцы, иглы, мед. инструменты	Неполная
	Сухим жаром	Печь Пастера	165-180оС, 1 час	Стеклянная посуда	Полная
	Паром под давлением	Автоклав	0,5 атм., 111оС, 30 мин 1 атм., 121оС, 20 мин 1,5 атм., 127оС, 20 мин 2 атм., 133оС, 15 мин	Питательные среды, физиологический раствор, перевязочный материал, обеззараживание инфицированного материала	Полная
Физическая стерилизация	Текучим паром	Аппарат Коха, автоклав	100оС, по 1 час, трехкратно, с суточным перерывом	Сыворотка крови, питательные среды с витаминами, желатином	Полная
	Пастеризация	Водяная баня	60-68оС, 10 мин с последующим быстрым охлаждением	Пищевые продукты	Неполная
	Тиндализация	Водяная баня	56-58оС по 1 час, 5-6 ней подряд	Сыворотка крови, витамины	Полная
	Фильтрование	Фильтр Зейтца		Сыворотки, антибиотики	Вирусы не удаляются
	УФ-лучами	Бактерицидные лампы	1 час	Воздух в боксах, операционных и др.	Частичная
	γ-излучение	В производственных условиях		Разовые системы для переливания крови, разовые шприцы, разовые чашки Петри	Полная
Химическая стерилизация		Добавление к питательным средам дезинфицирующих веществ (хлороформ, толуол, эфир)		Питательные среды и иммунобиологические препараты (сохранение)	Полная (применение ограничено)
Биологическая стерилизация		Применение антибиотиков		Культивирование вирусов	Удаление бактерий

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Размножение и рост бактерий

1. Среда, используемая для дифференциации прототрофов от аутокотрофов:

- а) дифференциально-диагностические в) селективные
- б) элективные г) специальные

2. Прокариоты не размножаются:

- а) бинарным делением в) почкованием
- б) митозом г) спорообразованием

3. Формирование перегородки между дочерними клетками без изменения диаметра материнской клетки происходит у:

- а) Гр⁺бактерий в) почкующихся бактерий
- б) Гр⁻бактерий г) диаметр всегда меняется

4. В жидких питательных средах аэробы образуют:

- а) поверхностную пленку в) придонный рост
- б) помутнение среды г) отсутствие роста

5. Количество клеток возрастает в геометрической прогрессии в:

- а) М – фазу в) лаг – фазу
- б) лог – фазу г) фазу гибели

6. Непрерывные культуры бактерий получают методом культивирования:

- а) стационарного в) проточного
- б) глубинного г) синхронного

7. Все утверждения о репликации ДНК бактерий верны, кроме:

- а) идет одним репликоном в) идет по полуконсервативному методу
- б) необходима для деления клетки г) полирепликонна

8. Наибольшая скорость роста бактериальной популяции наблюдается в:

- а) М – фазу в) лаг – фазу
- б) log – фазу г) фазу отрицательного ускорения

9. Среда, используемая для накопления определенного вида бактерий:

- а) элективные в) дифференциально-диагностические
- б) селективные г) специальные

20. Культура бактерий, клетки которой делятся одновременно:

- | | |
|-----------------|------------------|
| а) стационарная | в) периодическая |
| б) глубинная | г) синхронная |

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа №1.

Культивирование бактерий. Методы посева

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить методы посева бактерий в жидкие и плотные питательные среды.
2. Ознакомиться с основными типами питательных сред и с методами стерилизации.

Описательная часть лабораторного занятия.

Посев микроорганизмов осуществляется микробиологической петлей, микробиологической иглой, градуированной пипеткой или пастеровской пипеткой. Берут материал только стерильными инструментами. Петли и иглы фламбируют в пламени горелки, накаливая проволочные части докрасна. Затем, проводя несколько раз через пламя, стерилизуют и ближайший к проволоке отрезок держателя.

Следует, помнить, что прикосновение к материалу слишком горячей петлей или иглой может повредить микробов. Поэтому, прежде чем прикоснуться к материалу после фламбирования их охлаждают на воздухе, или прикасаясь к внутренним стерильным поверхностям посуды.

Пипетки перед употреблением стерилизуют завернутыми в бумагу, предварительно вставив кусочек ваты внутрь конца пипетки, с которым соприкасаются губы исследователя. Бумагу разворачивают со стороны ваты.

Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем омывают жидкой средой.

Плотные среды используют для посева материала на их поверхность и в толщу среды. Посев на поверхность производят петлей, шпателем или тампоном. Исследуемый материал наносят на поверхность питательной среды и затем равномерно рас-

пределяют его по всей поверхности шпателем или тампоном. Петлей распределяют материал штриховыми скользящими движениями по поверхности среды. При обилии в засеваемом материале микробов они дают сплошной рост по всей поверхности среды. Такой характер микробного роста называется сплошным или газонным.

Из накопительной культуры получают чистую культуру. Все методы основаны на выделении из популяции одной – единственной клетки, то есть осуществляется изолирование (выделение) микробов в форме клона (потомства одной клетки). Для этого культуру выращивают на плотной среде, где каждая бактериальная клетка дает рост в форме колонии.

Оснащение лабораторного занятия.

Флаконы со смесью бактерий *Bacillus subtilis* и *Ervinia carotovora*.

Чашки Петри с 15–20 мл стерильной питательной среды МПА.

Стерильные пипетки на 1–2 мл, бактериологические петли, стеклянные шпатели Дригальского, спиртовки, спички, стеклогграфы, фильтровальная бумага, стаканчики с 96° этанолом, банки с мыльным раствором.

Таблица «Способы посева бактерий в питательные среды».

Ход выполняемой работы.

1. Ознакомится с видами питательных сред и методами стерилизации.

2. Посеять суспензию бактерий на плотную питательную среду методом Дригальского с целью механического разобщения клеток и получения изолированных колоний. Для этого выполнить следующую последовательность действий:

- взять 3 чашки Петри с МПА, пронумеровать;
- зажечь спиртовку и все последующие действия проводить на расстоянии не более 5 см от пламени, где сохраняется стерильная зона;
- снять бумагу со стерильной пипетки и набрать в нее небольшое количество бактериальной суспензии;
- осторожно приоткрыв одной рукой крышку чашки Петри № 1, ввести под нее пипетку с суспензией и нанести на поверхность

среды каплю объемом 0,1 мл, закрыть крышку и поставить пипетку в банку с мыльным раствором;

- взять в одну руку стеклянный шпатель Дригальского, представляющий собой стеклянную палочку с загнутым в форме треугольника концом, а другой рукой слегка приоткрыть чашку Петри с каплей суспензии;

- окунуть шпатель в стаканчик со спиртом и быстро простерилизовать его, обжигая на пламени спиртовки;

- ввести шпатель под крышку чашки Петри №1, остудить о внутреннюю ее поверхность и растереть каплю суспензии, двигая шпатель сначала взад и вперед на небольшом участке, а затем круговыми движениями по всей поверхности питательной среды;

- вынуть шпатель из чашки № 1, закрыть ее и быстро перенести шпатель в чашку № 2, не обжигая его, растереть материал по всей поверхности среды, прикасаясь к ней той же стороной шпателя, которой растирался материал в чашке № 1, закрыть чашку № 2;

- так же перенести шпатель в чашку № 3 и растереть материал по поверхности питательной среды той же стороной шпателя;

- шпатель окунуть в стаканчик со спиртом и прожечь в пламени спиртовки;

- чашки перевернуть вверх дном, подписать и поставить в термостат при температуре 25°C.

3. Посеять суспензию бактерий методом истощающего штриха с целью механического разобщения клеток и получения изолированных колоний. Для этого выполнить следующую последовательность действий:

- зажечь спиртовку и все последующие действия проводить на расстоянии не более 5 см от пламени, где сохраняется стерильная зона;

- профламбировать бактериологическую петлю в пламени спиртовки;

- ввести петлю во флакон с суспензией бактерий, остудить о внутренние стенки флакона и поддеть часть суспензии;

- другой рукой осторожно приоткрыть чашку Петри и ввести в нее петлю с суспензией;

- держа петлю плоской стороной параллельно поверхности среды, чтобы не резать ее, нанести ею у края чашки первый штрих;

– вынуть петлю из чашки и прожечь ее в пламени спиртовки для стерилизации;

– опять ввести петлю в чашку, остудить о ее внутреннюю поверхность или о край чистой среды и сделать несколько (3-4) перпендикулярных штриха, начиная их из первого штриха и не доводя дальше середины чашки;

– опять вынуть петлю, прожечь, ввести в чашку третий раз, остудить и сделать по поверхности среды зигзагообразный штрих, начиная его от края перпендикулярных штрихов;

– вынуть петлю из чашки, закрыть ее, обжечь петлю в пламени и поставить в штатив;

– чашку перевернуть вверх дном, подписать и поставить в термостат при температуре 25 °С.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 1. Способы размножения прокариот.
2. Таблица 2. Классификация питательных сред по консистенции.
3. Таблица 3. Классификация питательных сред по назначению

4. Таблица 4. Классификация бактериальных культур.

5. Таблица 5. Виды стерилизации.

б) Выучить:

1. Виды размножения прокариот.
2. Особенности репликации наследственного материала у прокариот.
3. Принципы и методы культивирования бактерий.
4. Понятие о стерилизации, способы стерилизации.
5. Типы питательных сред по составу и консистенции
6. Особенности культивирования анаэробов
7. Принципы выделения и идентификации чистой культуры аэробов и анаэробов.
8. Виды бактериальных культур

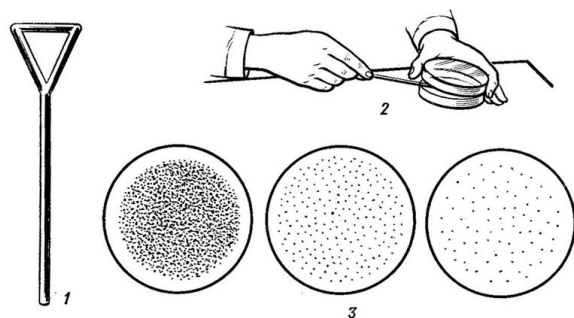
Рабочее задание:

1. Изучить устройство светового биологического микроскопа.
2. Составить таблицу «Устройство светового биологического микроскопа», записать в альбом
3. Изучить правила работы с иммерсией, записать в рабочую тетрадь.
4. Микроскопировать микробиологический препарат при малом и иммерсионном увеличении, сравнить изображения.
5. Зарисовать просмотренные изображения в альбом.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Метод посева бактерий по Дригальскому.
2. Рис. 2. Варианты метода посева бактерий истощающим штрихом
3. Рис. 3. Схема выделения и идентификации чистой культуры бактерий.

Пример заполнения альбома:



Посев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды шпателем

- 1.шпатель Дригальского
- 2.посев
- 3.рост микроорганизмов после посева

Рис. 1. Метод посева бактерий по Дригальскому

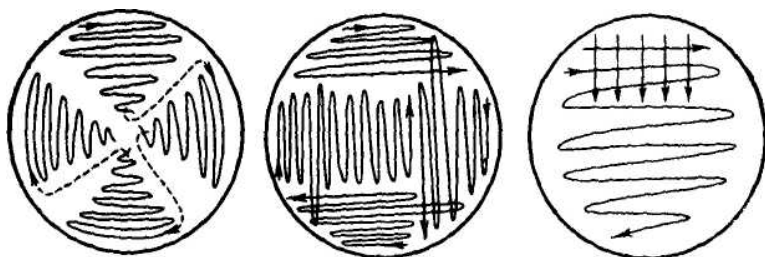


Рис. 2. Варианты метода посева бактерий истощающим штрихом

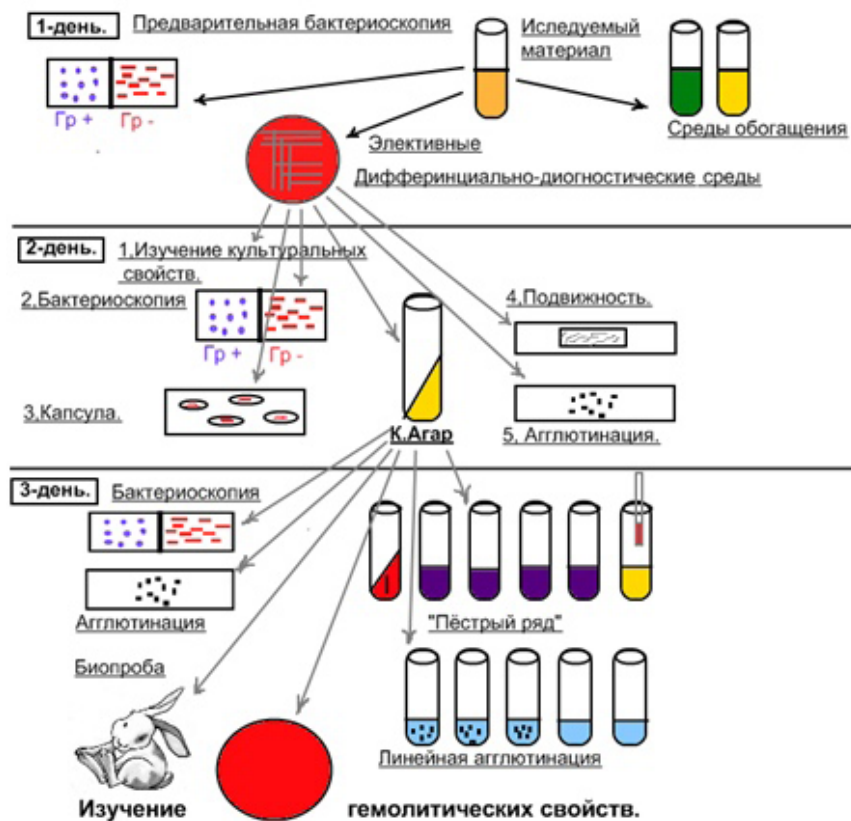


Рис. 3. Схема выделения и идентификации чистой культуры бактерий

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
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, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.
5. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
6. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 2.

«Культуральные признаки бактерий.

Посев на накопление чистой культуры».

1. Питание и дыхание бактерий.
2. Принципы классификации бактерий по типу питания.
3. Классификация бактерий по типу питания.
4. Механизмы питания бактерий.
5. Ферменты бактерий.
6. Культивирование бактерий.

ТЕМА 2. ПИТАНИЕ ПРОКАРИОТ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Типы питания бактерий.

Питание – это поглощение и усвоение веществ, необходимых для жизнеобеспечения.

Прокариоты характеризуются широким многообразием физиологических возможностей, поэтому имеют разные типы питания. Тип питания определяется в зависимости от источника углерода для синтеза собственных органических веществ, от источника энергии для синтетических процессов, от донора электронов для восстановительных реакций и от источника азота для синтеза азотсодержащих органических веществ.

По источникам углерода, необходимого для построения биополимеров, бактерии делятся на следующие группы:

- автотрофы – микроорганизмы, которые используют как единственный источник углерода углекислый газ и не нуждаются в сложных органических соединениях;
- гетеротрофы – микроорганизмы, которые используют в качестве источника углерода разнообразные органические углеродсодержащие соединения (углеводы, углеводороды, аминокислоты, органические кислоты). К ним относятся бактерии-паразиты и сапрофиты, которые питаются мертвым органическим субстратом.

В зависимости от источника получения энергии микроорганизмы делятся:

- на фототрофные, способные использовать солнечную энергию,
- хемотрофные, получающие энергию за счет окислительно-восстановительных реакций.

В зависимости от природы доноров электронов различаются:

- литотрофы, у которых донор электронов – неорганические вещества (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe^{2+})
- органотрофы – использующие в качестве донора электронов только органические соединения. К последним принадлежит значительное большинство бактерий, в том числе патогенные для человека виды.

В зависимости от сочетания указанных критериев определения типа питания выделяют 8 типов питания, представленных у прокариот: фотолитоавтотрофия, фотолитогетеротрофия, фотоорганотрофия, фотоорганогетеротрофия, хемолитоавтотрофия, хемолитогетеротрофия, хемоорганотрофия, хемоорганогетеротрофия.

По источникам азота бактерии бывают:

- аминокислототрофы, у которых источник азота – неорганические вещества (N_2 , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-). К ним относятся: азотфиксирующие микроорганизмы – способны усваивать молекулярный азот атмосферы; аммонифицирующие – ассимилируют соли ам-

мония, нитратредуцирующие – восстанавливают нитраты и нитритредуцирующие – восстанавливают нитриты.

- **аминогетеротрофы**, источник азота которых – готовые органические азотсодержащие вещества. Большинство патогенных для человека микроорганизмов способны ассимилировать только азот органических соединений.

Микроорганизмы, способные синтезировать все необходимые им органические соединения (углеводы, аминокислоты и др.) из глюкозы и солей аммония, называются прототрофами.

Микроорганизмы, неспособные синтезировать какое-либо из необходимых соединений и ассимилирующие их в готовом виде из окружающей среды или организма хозяина (человека, животного), называются ауксотрофами по этому соединению. Чаще всего ими являются патогенные или условно-патогенные для человека микроорганизмы. Необходимые для них питательные вещества называются факторы роста.

2. Типы дыхания бактерий.

Характер питания тесно связан с дыханием бактерий, от которого зависит способ усвоения питательных веществ в процессе метаболизма.

Тип дыхания зависит от отношения бактерий к наличию кислорода в окружающей среде. По этому признаку бактерии делятся на 3 основные группы: аэробы (требуют наличия кислорода в среде), анаэробы (требуют отсутствия кислорода в среде) и факультативные анаэробы (не зависят от наличия или отсутствия кислорода в среде, могут менять тип дыхания в зависимости от условий среды).

3. Механизмы питания прокариот.

Процесс, в ходе которого бактериальная клетка получает из окружающей среды вещества, необходимые для построения ее собственных биополимеров, называется механизмом питания.

Основными химическими компонентами бактериальной клетки являются органогены – кислород, водород, углерод, азот, фосфор. По химическому составу и характеру биополимеров (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды) прокариотические клетки не отличаются от эукариотических.

Бактериальные клетки не имеют специальных органов питания, т. е. являются голофитными. В клетку проникают только мел-

кие молекулы. Крупные молекулы подвергаются расщеплению вне клетки белками-экзоферментами.

Избирательное поступление питательного субстрата в клетку прокариот регулируется ЦПМ, от которой зависят механизмы питания. Процесс переноса вещества через ЦПМ называется пенетрацией (лат. *penetratio* проникновение), а переносимое вещество – пенетрант.

Поступление веществ в микробную клетку может происходить за счет:

- осмоса и простой диффузии по градиенту концентрации без затрат энергии;
- облегченной диффузии, которая также осуществляется по градиенту концентрации без затрат клеткой энергии, но с помощью белков-переносчиков (ферменты – пермеазы), и отличается от простой диффузии большей скоростью;
- активного транспорта, который идет против градиента концентрации с затратой энергии и, осуществляется белками-переносчиками. При этом возможно: химическое преобразование субстрата – это называется транслокация групп; химическое преобразование переносчика – это пермеазный активный транспорт; образование канала в определенных мембранных белках – это ионный насос.

4. Ферменты бактерий.

Для питания необходимы ферменты, т.к. обработка поступившего субстрата осуществляется с их помощью.

По типу катализируемой ферментом реакции у прокариот есть все 6 основных класса ферментов. Это оксидоредуктазы, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции; трансферазы, обеспечивающие перенесение химических группировок; гидролазы, функцией которых является расщепление органических веществ с участием воды; лиазы отщепляющие химические группы с образованием двойной связи или присоединяющие химические группы по месту двойной связи; изомеразы, выполняющие внутримолекулярные перестройки и лигазы (синтетазы), отвечающие за соединение молекул (синтез сложных органических веществ) с использованием энергии.

По месту действия фермента различают эндоферменты, которые обеспечивают протекание реакций внутри клетки (на ЦПМ

или в цитоплазме), и экзоферменты, выделяющиеся в периплазматическое пространство и во внешнюю среду. Их задача – преобразование веществ вне клетки, расщепление крупных пищевых частиц и молекул до более мелких.

По способу генетической регуляции синтеза фермента можно выделить конститутивные ферменты, обеспечивающие в клетке протекание реакций базового метаболизма. Они синтезируются постоянно в течение всего жизненного цикла. Синтез другой группы ферментов, которые называются индуцибельные, происходит только тогда, когда в клетку поступает субстрат данного фермента. Наконец, есть ферменты репрессибельные, синтез которых блокируется продуктом реакции, катализируемой этим ферментом.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 6. Критерии определения типа питания бактерий

Критерий	Название группы бактерий	Характеристика
По источнику углерода для синтеза собственных органических веществ	автотрофы	Источник углерода – неорганическое вещество CO_2
	гетеротрофы	Источник углерода – готовые органические вещества
По источнику энергии для синтетических процессов	фототрофы	Источником энергии является свет
	хемотрофы	Используют энергию окислительно-восстановительных реакций
По донору электронов для восстановительных реакций	литотрофы	Донор электронов – неорганические вещества (H_2 , NH_3 , H_2S , Fe^{2+})
	органотрофы	Донор электронов – органические вещества
По источнику азота для синтеза азотсодержащих органических веществ	аминоавтотрофы	Источник азота – неорганические вещества (N_2 , NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-)

Таблица 7. Типы питания прокариот

Тип питания	Представители прокариот
фотолитоавтотрофия	Пурпурные и зеленые серные бактерии, цианобактерии
фотолитогетеротрофия	Некоторые цианобактерии
фотоорганотрофия	Пурпурные и зеленые несерные бактерии
фотоорганогетеротрофия	Некоторые зеленые и пурпурные бактерии, галобактерии

Тип питания	Представители прокариот
хемолитоавтотрофия	Нитрификаторы, тионовые, водородные, железобактерии
хемолитогетеротрофия	Некоторые сульфатредукторы, метанобактерии
хемоорганавтотрофия	Некоторые факультативные метилотрофы
хемоорганогетеротрофия	Большинство бактерий: все сапрофиты и паразиты

Таблица 8. Типы дыхания прокариот

Микроорганизмы по типу дыхания	Требуемые условия аэрации	Примеры
Облигатные аэробы	Широкий доступ кислорода	Холерный вибрион, псевдомонады, скользющие бактерии
Микроаэрофилы	Пониженное содержание кислорода	Бруцеллы, спириллы, некоторые нитрификаторы
Факультативные анаэробы	Могут менять тип дыхания с аэробного на анаэробный и наоборот	Большинство патогенных бактерий
Облигатные анаэробы	Отсутствие кислорода	Клостридии, метанобактерии

Таблица 9. Ферменты бактерий

Принцип классификации ферментов	Название класса ферментов	Характеристика
По типу катализируемой ферментом реакции	Оксидоредуктазы Трансферазы Гидролазы Лиазы Изомеразы Лигаза (синте-тазы)	Окислительно-восстановительные реакции. Перенесение химических группировок. Расщепление органических веществ с участием воды. Отщепление групп с образованием двойной связи или присоединение групп по двойной связи. Внутримолекулярные перестройки. Соединение молекул с использованием энергии.
По месту действия фермента	Эндоферменты Экзоферменты	В цитоплазме. В периплазматическом пространстве и во внешней среде.
По способу генетической регуляции синтеза фермента	Конститутивные (постоянные) Индукцибельные Репрессибельные	1. Синтезируются в течение всего жизненного цикла. 2. Синтез индуцируется субстратом данного фермента, попадающим в клетку. 3. Синтез блокируется продуктом реакции, катализируемой ферментом.

Таблица 10. Основные механизмы питания прокариот

Вид транспорта	Сущность механизма	Примеры пенетрантов
Простая диффузия	Идет по градиенту концентрации веществ, не требует затрат энергии.	Вода, растворенные мелкие молекулы
Облегченная диффузия	Идет по градиенту концентрации, без затрат энергии, с помощью белков-пермеаз.	Глицерин
Активный транспорт:	Идет против градиента концентрации, с затратами энергии:	
а) пермеазный	а) в процессе транспорта происходит химическая модификация пермеазы, снижающая ее сродство к пенетранту;	а) аминокислоты;
б) транслокация групп	б) в процессе транспорта происходит химическая модификация (например, фосфорилирование) пенетранта, что препятствует их обратному выходу;	б) моносахариды;
в) ионные насосы	в) образуются каналы в определенных мембранных белках, через которые проходит пермеант.	в) ионы (K^+ / Na^+ , Ca^{2+})

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Питание бактерий

1. Бактерии-паразиты по источнику углерода для питания являются:

- | | |
|------------------|------------------|
| а) автотрофами | в) хемотрофами |
| б) гетеротрофами | г) органотрофами |

2. Поступление в бактериальную клетку только мелких молекул связано с работой ферментов:

- | | |
|------------------|--------------------|
| а) индуцибельных | в) экзоферментов |
| б) эндоферментов | г) репрессибельных |

3. Идет против градиента концентрации с использованием энергии:

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| а) простая диффузия | в) такого транспорта нет |
| б) облегченная диффузия | г) активный транспорт |

4. Источником энергии являются окислительно-восстановительные реакции у:

- | | |
|---------------|-----------------|
| а) хемотрофов | в) гетеротрофов |
| б) фототрофов | г) автотрофов |

5. Микроорганизмы, использующие энергию окисления неорганических соединений и самостоятельно синтезирующие органические вещества из неорганического углерода:

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| а) фотолитоавтотрофы | в) фотоорганавтотрофы |
| б) хемолитоавтотрофы | г) хемоорганогетеротрофы |

6. Микроорганизмы, использующие энергию света и окисление неорганических веществ для восстановления CO_2 :

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| а) хемолитоавтотрофы | в) фотоорганавтотрофы |
| б) фотолитоавтотрофы | г) хемоорганогетеротрофы |

7. Идет по градиенту концентраций без использования энергии и пермеаз:

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| а) облегченная диффузия | в) активный транспорт |
| б) простая диффузия | г) такого транспорта нет |

8. Для восстановительных реакций используют электроны органических соединений:

- | | |
|--------------|----------------|
| а) автотрофы | в) органотрофы |
| б) фототрофы | г) литотрофы |

9. Микроорганизмы, нуждающиеся для развития в факторах роста:

- | | |
|---------------|----------------|
| а) автотрофы | в) гетеротрофы |
| б) ауксотрофы | г) прототрофы |

10. Нуждаются для развития в готовых азотистых основаниях:

- | | |
|----------------------|----------------------------|
| а) аминокислототрофы | в) аминокислотогетеротрофы |
| б) хемогетеротрофы | г) хемоавтотрофы |

11. Ферменты, выработка которых в клетке микроорганизмов зависит от появления в среде субстрата:

- | | |
|--------------------|-------------------|
| а) индуцибельные | в) конститутивные |
| б) репрессибельные | г) факторы роста |

12. Бактерии, использующие в качестве источника углерода мертвую органику:

- | | |
|--------------|--------------|
| а) автотрофы | в) паразиты |
| б) хемотрофы | г) сапрофиты |

13. Источником электронов для восстановления CO_2 с использованием энергии света являются органические вещества у:

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| а) фотоорганавтотрофов | в) фотоорганогетеротрофов |
| б) фотолитоавтотрофов | г) хемоорганогетеротрофов |

14. Источником энергии для синтетических процессов не являются окислительно-восстановительные реакции у:

- | | |
|---------------|--------------------|
| а) хемотрофов | в) ауксотрофов |
| б) фототрофов | г) аминокетотрофов |

15. Химическая модификация в процессе трансмембранного переноса пенетранта – это:

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| а) облегченная диффузия | в) ионные насосы |
| б) простая диффузия | г) транслокация групп |

16. Идет по градиенту концентрации без использования энергии с помощью пермеаз:

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| а) простая диффузия | в) такого транспорта нет |
| б) облегченная диффузия | г) активный транспорт |

17. Микроорганизмы, способные создавать свою органику за счет органического вещества, поступающего извне с использованием энергии окисления органического субстрата:

- | | |
|--------------------------|----------------------|
| а) хемоорганогетеротрофы | в) фотолитоавтотрофы |
| б) фотоорганавтотрофы | г) хемолитоавтотрофы |

18. Микроорганизмы, способные синтезировать все необходимые для жизни вещества:

- | | |
|---------------|----------------|
| а) прототрофы | в) автотрофы |
| б) ауксотрофы | г) гетеротрофы |

19. Источником электронов для восстановительных реакций являются неорганические соединения у:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| а) гетеротрофов | в) органотрофов |
| б) литотрофов | г) ауксотрофов |

20. Могут использовать атмосферный азот:

- | | |
|-------------------|-------------------|
| а) хемотрофы | в) фототрофы |
| б) аминокетотрофы | г) аминокетотрофы |

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа №2.

Культуральные свойства бактерий

Цель лабораторного занятия:

1. Научиться анализировать культуральные свойства бактерий и делать посевы на скошенный агар.

2. Ознакомиться с морфологическими типами бактериальных колоний и этапами идентификации бактериальной культуры.

Описательная часть лабораторного занятия.

Чистые культуры используют для идентификации микроорганизмов. Чистоту культуры проверяют визуально или путем микроскопирования.

Важным диагностическим признаком при идентификации бактерий являются культуральные свойства, которые определяются характером их роста на плотных, жидких и полужидких питательных средах. Они индивидуальны для каждого вида микробов. Характер роста на плотной среде в чашке Петри описывают, сначала просматривая чашки с посевом невооруженным глазом или через лупу, отмечая отдельные колонии восковым карандашом или чернилами со стороны дна чашки. Затем чашки Петри без крышек помещают на столик микроскопа вверх дном и просматривают отмеченные колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и суженной диафрагмой. Колонии характеризуют по следующим признакам: величине, форме, прозрачности, контуру края, рельефу поверхности, цвету, структуре и консистенции.

На жидких питательных средах (МПБ, сахарном бульоне и др.) характер роста микробов менее разнообразен, чем на плотных питательных средах. Однако и здесь выявлены следующие формы роста бактерий:

Рост бактерий с равномерным помутнением среды, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроба. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

Придонный рост бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Придонный рост специфичен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

Пристеночный рост бактерий выражается в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя более или менее крупные рыхлые хлопья или наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда.

Поверхностный рост бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различны. Рост микробов в виде поверхностно плавающей пленки характерен для микробов – аэрофилов.

Оснащение лабораторного занятия.

Чашки Петри с посевами бактерий *B. subtilis* и *E. carotovora*, сделанными студентами на предыдущем занятии. Пробирки со скошенным агаром (МПА) в штативах.

Кристаллизаторы, препаратодержатели, предметные и покровные стекла, спиртовки, спички, бактериологические петли.

Бумажки Синева, капельницы с раствором Люголя, с фуксином Пфейфера, с 96% этанолом, флаконы с водой, фильтровальная бумага, стеклографы.

Микроскопы, флаконы с иммерсионным маслом, тряпочки для протирания оптики.

Таблицы с изображением морфологических типов колоний и схемой выделения и идентификации чистой культуры.

Ход выполняемой работы.

1. Просмотреть чашки с посевом на выделение чистой культуры, выбрать «подозрительную» колонию и описать по следующей схеме, представленной в таблице 11:

Таблица 11. Характеристика морфологии и микроскопического состава выделенных колоний

Признаки	Характеристика
Размер	Крупная (> 5 мм), средняя (2–5 мм), мелкая (1–2 мм), точечная (< 1 мм)
Форма	Правильная, округлая, неправильная, овальная, выпуклая, плоская, вдавленная и др.
Поверхность	Гладкая (S-формы), шероховатая (R-формы), морщинистая, бугристая, блестящая, матовая, радиально-исчерченная и др.
Края	Ровные, фестончатые, зубчатые, волокнистые, бахромчатые, волнистые, изрезанные и др.
Цвет	Бесцветная, пигментированная (цвет пигмента)
Структура	Гомогенная, зернистая, волокнистая, прозрачная, непрозрачная, различающаяся в центре и на периферии, однородная.
Консистенция	Мягкая, плотная, сухая, хрупкая, влажная
Микроскопический состав	Морфология бактерий, тинкториальные свойства

2. С соблюдением правил стерильности снять часть бактерий из описанной колонии, приготовить мазок, окрасить по Граму и просмотреть с иммерсией.

3. Из оставшейся части описанной колонии сделать пересев в пробирку на скошенный агар для накопления чистой культуры. С этой целью выполнить следующую последовательность действий:

- поставить чашку Петри с исследуемой колонией рядом со спиртовкой возле левой руки работающего;

- взять в правую руку петлю, профламбировать в пламени спиртовки, а левой рукой осторожно приподнять крышку чашки Петри, ввести петлю в чашку, остудить о внутреннюю поверхность или чистую часть среды и снять остаток изучаемой колонии;

- аккуратно вынуть петлю с культурой из чашки, не задевая ее концом ни за какие предметы; закрыть чашку, отставить ее в сторону и взять в левую руку пробирку со скошенным агаром (МПА), закрытую ватной пробкой так, чтобы хорошо было видно поверхность скоса;

- мизинцем правой руки, удерживая на весу петлю и не отводя ее далеко от пламени спиртовки, вынуть пробку из пробирки и ввести в пробирку петлю с культурой;

- опустить петлю с культурой до низа пробирки, где скапливается конденсационная вода и осторожно провести петлей прямую или зигзагообразную черту по середине поверхности среды, стараясь не царапать агар (если необходимо накопить больше выделенной культуры, то делают дополнительно еще на один «косяк» сплошной посев, размазав материал по всей поверхности питательной среды);

- вынуть петлю из пробирки и закрыть ее ватной пробкой, предварительно быстро проведя ее часть, которая входит в пробирку, через пламя спиртовки;

- петлю прожечь в пламени спиртовки и отложить в сторону;

- пробирку с посевом подписать и поставить на инкубацию в термостат.

4. Перерисовать в альбом с таблицы морфологические типы колоний.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

Таблицы:

1. Таблица 6. Критерии определения типа питания бактерий
2. Таблица 7. Типы питания прокариот.
3. Таблица 8. Типы дыхания прокариот.
4. Таблица 9. Основные механизмы питания прокариот.
5. Таблица 10. Ферменты бактерий.

б) *Выучить:*

1. Питание и дыхание бактерий.
2. Принципы классификации бактерий по типу питания.
3. Классификация бактерий по типу питания.
4. Механизмы питания бактерий.
5. Ферменты бактерий.

Рабочее задание:

1. Просмотреть посевы бактерий на чашках Петри, сделанные методами Дригальского и истощающего штриха.

2. Выбрать «подозрительную» колонию и описать ее по стандартной схеме.

3. Сделать посев из выбранной колонии в пробирку на скошенный агар для накопления чистой культуры.

4. Для определения микроскопического состава описанной колонии приготовить из нее мазок, окрасить по Граму,

5. Промикроскопировать готовый микробиологический препараты с иммерсией и определить морфологические признаки изучаемой культуры.

Содержание альбома:

1. Таблица 11: Характеристика морфологии и микроскопического состава выделенных колоний.

2. Рис. 4. Колонии бактерий различной морфологии на чашке Петри.

Пример заполнения альбома:



Рис. 4. Колонии бактерий различной морфологии на чашке Петри

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
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, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.
5. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
6. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>
7. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова. – М., 2005. – 608 с.

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 3.

«Биохимические свойства бактерий»

1. Понятие о метаболизме бактерий. Энергетический и пластический обмен.
2. Субстратное фосфорилирование.
3. Брожение, виды брожения.
4. Окислительное фосфорилирование.
5. Анаэробное дыхание, виды.
6. Синтез углеводов, виды.
7. Специфика синтеза аминокислот, липидов и белков у бактерий.

Тема 3. МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Особенности метаболизма прокариот.

Метаболизм (обмен веществ) бактерий представляет собой совокупность 2 взаимосвязанных противоположных процессов: катаболизма и анаболизма.

Катаболизм (диссимиляция), энергетический обмен – распад веществ в процессе ферментативных реакций и накопление выделяемой при этом энергии в молекулах АТФ.

Анаболизм (ассимиляция), конструктивный метаболизм – синтез веществ с затратой энергии.

Особенности метаболизма у бактерий состоят в том, что:

- его интенсивность имеет достаточно высокий уровень, что возможно обусловлено гораздо большим соотношением поверхности к единице массы, чем у многоклеточных;
- процессы диссимиляции преобладают над процессами ассимиляции;
- субстратный спектр потребляемых бактериями веществ очень широк – от углекислого газа, азота, нитритов, нитратов до органических соединений, включая антропогенные вещества – загрязнители окружающей среды (обеспечивая тем самым процессы ее самоочищения);
- бактерии имеют очень широкий набор различных ферментов – это также способствует высокой интенсивности метаболических процессов и широте субстратного спектра.

2. Энергетический метаболизм

Синтез биополимеров бактериальной клетки требует энергии. Она образуется в ходе биологического окисления и запасается в виде молекул макроэргов – АТФ и АДФ.

Способы получения энергии у бактерий отличаются своеобразием, связанным с разными типами дыхания. Дыхание микроорганизмов представляет собой совокупность биохимических аэробных и анаэробных процессов по освобождению энергии, используемой для их жизнедеятельности.

По типу дыхания выделяют три группы бактерий:

- первая группа – облигатные аэробы, которые способны получать энергию только путем дыхания и нуждаются в молекулярном кислороде как конечном акцепторе электронов. Для них как тип окислительно-восстановительных процессов характерно окисление, при котором конечным акцептором электронов является кислород.

- вторая группа – облигатные анаэробы – бактерии, способные расти только в среде, лишенной кислорода. Для них как тип окислительно-восстановительных процессов характерна ферментация, при которой происходит перенос электронов от субстрата-донора к субстрату-акцептору.

- третья группа – факультативные анаэробы – бактерии, способные расти как в присутствии, так и в отсутствии кислорода, и использовать в качестве терминальных акцепторов электронов как молекулярный кислород, так и органические соединения. То есть, они могут переключать тип катаболизма с окисления на ферментацию (энтеробактерии), а аэротолерантные факультативно-анаэробные бактерии могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не используют его, а получают энергию исключительно с помощью брожения.

Основной источник энергии для большинства микробов – глюкоза. Расщепление глюкозы начинается с серии окислительно-восстановительных реакций, в ходе которых образуются нестабильные фосфорилированные молекулы, с которых остаток фосфорной кислоты переносится на АДФ с образованием АТФ и накапливаются восстановленные коферменты НАД · Н и НАДФ · Н. Это называется субстратное фосфорилирование. В ходе него происходит неполное расщепление глюкозы до пировиноградной кислоты (ПВК).

У бактерий описано 3 вида субстратного фосфорилирования:

1. Гликолиз (путь Эмбдена–Мейергофа-Парнаса). Важнейшие промежуточные продукты здесь: фруктозо-1,6дифосфат и фосfogлицериновый альдегид (ФГА). Энергетический выход: 2 АТФ, 2 НАД · Н.

2. Пентозофосфатный путь (Варбурга-Диккенса-Хорекера). Важнейшие промежуточные продукты: фосfogлюконовая кислота, пентозы (которые используются при синтезе нуклеиновых кислот), ФГА. Энергетический выход: 1 АТФ, 2 НАДФ · Н, 1 НАД · Н.

3. Кетодезоксифосfogлюконатный путь (Этнера-Дудорова). Он встречается только у прокариот. Важнейшие промежуточные

продукты: фосфоглюконовая кислота и кетодезоксифосфоглюконовая кислота (КДФГК). Энергетический выход: 1 АТФ, 1 НАДФ · Н, 1 НАД · Н.

Наиболее распространенным и энергетически выгодным путем субстратного фосфорилирования является гликолиз.

В отсутствии кислорода происходит восстановление ПВК накопленными электронами. Это процесс брожения. В зависимости от характера конечных продуктов восстановления различают брожение:

- спиртовое,
- молочнокислое (оно может быть гомоферментное и гетероферментное),
- пропионовокислое,
- муравьинокислое,
- маслянокислое,

Бактерии, осуществляющие брожение, могут быть факультативными или облигатными анаэробами. Так, маслянокислое брожение осуществляют облигатные анаэробы – клостридии.

Максимальная мобилизация энергии происходит в процессе окислительного фосфорилирования через цикл трикарбоновых кислот и дыхательную цепь в аэробных условиях. При этом происходит окисление восстановленных соединений с переносом электрона через локализованную в мембране дыхательную электронтранспортную цепь, создающую трансмембранный градиент протонов, при использовании которого синтезируется АТФ. Это и есть окислительное фосфорилирование. Конечным акцептором электрона при этом является кислород, а ключевым ферментом цитохромоксидаза.

В анаэробных условиях ряд бактерий может мобилизовать значительное количество энергии в ходе анаэробного дыхания. Некоторые прокариоты обладают возможностью использовать в качестве акцептора электрона в дыхательной электронтранспортной цепи вместо кислорода различные окисленные соединения азота. Это нитратное дыхание. Ферментом, катализирующим финальную стадию транспорта электрона является нитратредуктаза. В настоящее время известны также бактерии, способные окислять органические соединения или молекулярный водород в анаэробных условиях, используя в качестве акцепторов электронов в дыхательной цепи сульфаты, тиосульфаты, сульфиты, молекулярную серу. Этот

процесс получил название сульфатное дыхание, а ключевой фермент – сульфатредуктаза.

У археобактерий встречается фотофосфорилирование с участием бактериородопсина, при котором энергия света используется непосредственно для синтеза АТФ.

3. Конструктивный метаболизм.

Пластический метаболизм включает в себя, в первую очередь, синтез углеводов, липидов и белков.

Синтез углеводов может быть автотрофный и гетеротрофный.

Автотрофный синтез углеводов происходит путем фотосинтеза или хемосинтеза.

Фотосинтез бактерий может быть двух типов – бескислородный (аноксигенный), с использованием бактериохлорофилла (зелёные, пурпурные и гелиобактерии) и кислородный (оксигенный) с использованием хлорофилла а (цианобактерии).

К бактериям, осуществляющим бескислородный фотосинтез, относятся пурпурные и зеленые серобактерии, которых донором водорода (электронов) служат H_2S , S , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, а также пурпурные и зеленые несерные бактерии, донором водорода (электронов) у которых являются органические вещества. У цианобактерий донором водорода (электронов) является вода.

Хемосинтез происходит только у прокариот. Источником энергии для синтеза органических веществ из CO_2 в этом случае служат реакции окисления неорганических соединений H_2 (водородные бактерии), H_2S , S , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (апигментные серобактерии), NH_4^+ (нитрозобактерии), NO_2^- (нитробактерии), Fe^{2+} (железобактерии).

Во всех случаях автотрофного синтеза фиксация CO_2 с образованием глюкозы происходит в цикле Кальвина.

Синтез липидов происходит по таким же метаболическим путям, что и у эукариот.

Синтез аминокислот происходит в результате реакций аминирования органических кислот и переаминирования готовых аминокислот.

Синтез белка прокариот характеризуется тем, что процессы транскрипции и трансляции не разделены в пространстве и почти не разделены во времени.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.



Таблица 12. **Виды субстратного фосфорилирования у прокариот**

Название	Важнейшие промежуточные продукты	Энергетический выход	Представители прокариот
Гликолиз (путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса)	Фруктозо-1,6дифосфат, Фосфоглицериновый альдегид (ФГА)	2 АТФ, 2 НАД · Н	Большинство ФАН и анаэробов
Пентозофосфатный путь (Варбурга–Диккенса–Хорекера)	Фосфоглюконовая кислота, пентозы, ФГА	1 АТФ, 2 НАДФ · Н, 1 НАД · Н	Энтеробактерии, молочнокислые гетероферментные бактерии
Кетодезоксифосфоглюконатный путь (Этнера–Дундурова)	Фосфоглюконовая кислота, кетодезоксифосфоглюконовая кислота (КДФГК)	1 АТФ, 1 НАДФ · Н, 1 НАД · Н	В основном аэробы (псевдомонады, ацетобактерии)

Таблица 13. **Основные виды автотрофного синтеза углеводов**

Вид синтеза	Источник энергии	Донор электронов	Побочные продукты реакций	Представители прокариот
Оксигенный фотосинтез	свет	хлорофилл а, вода	O ₂	Цианобактерии
Аноксигенный фотосинтез	свет	бактериохлорофиллы, H ₂ S, S, SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻	Пурпурные и зеленые серобактерии
		бактериохлорофиллы, органические в-ва	органические вещества	Пурпурные и зеленые несерные бактерии
Хемосинтез	окисление H ₂	обратный перенос электронов	H ₂ O	Водородные бактерии
	окисление H ₂ S, S, SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻		SO ₄ ²⁻	Тионовые бактерии (аpigментные серобактерии)
	NH ₄ ⁺		NO ₂ ⁻	Нитрозобактерии
	NO ₂ ⁻		NO ₃ ⁻	Нитробактерии
	Fe ²⁺		Fe ³⁺	Железобактерии

Таблица 14. **Виды брожения**

Название	Важнейшие конечные продукты	Представители прокариот
Молочнокислое а) гомоферментное б) гетероферментное	а) молочная кислота б) молочная к-та, уксусная к-та, этанол, глицерин, CO ₂	а) ФАН: молочнокислые стрептококки, некоторые лактобациллы б) аэротолерантные АН: бифидобактерии
Спиртовое	Этанол	ФАН: дрожжи, эввинии

Название	Важнейшие конечные продукты	Представители прокариот
Муравьинокислое (смешанное)	Муравьиная к-та, молочная к-та, уксусная к-та	ФАН: многие энтеробактерии
Пропионовокислое	Пропионовая к-та	аэротолерантные АН: пропионо-бактерии
Маслянокислое: а) сахаролитическое (расщепление сахаров); б) протеолитическое (расщепление белков и аминокислот)	Масляная к-та: а) уксусная к-та, молочная к-та б) уксусная к-та, бутанол, ацетон	строгие АН: клостридии

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Метаболизм бактерий

1. Источником водорода при фотосинтезе являются органические вещества у:

- а) цианобактерий
- б) пурпурных серобактерий
- в) пурпурных несерных бактерий
- г) зеленых серобактерий

2. Могут менять способ катаболизма:

- а) аэробы
- б) анаэробы
- в) факультативные анаэробы
- г) микроаэрофилы

3. Максимальная мобилизация энергии происходит:

- а) при гликолизе
 - б) в цикле Кребса
 - в) при брожении
 - г) в цикле Кальвина
- и дыхательной цепи

4. У строгих анаэробов осуществляется брожение:

- а) спиртовое
- б) молочнокислое
- в) пропионовокислое
- г) маслянокислое

5. Основным источником пентоз является:

- а) гликолиз
- б) ПФ путь
- в) КДФГ путь
- г) брожение

6. На стадии элонгации при синтезе белка не происходит:

- а) соединения и-РНК с рибосомой
- б) присоединение к и-РНК комплементарных т-РНК
- в) проявление активности ПТФ-азы
- г) смещение рибосомы на 1 триплет

7. Нитратредуктаза – фермент, необходимый для:
- а) субстратного фосфорилирования
 - б) окислительного фосфорилирования
 - в) брожения
 - г) анаэробного дыхания
8. Наиболее энергетически выгодный процесс:
- а) субстратное фосфорилирование
 - б) окислительное фосфорилирование
 - в) анаэробное окисление
 - г) брожение
9. Вещество, используемое в энергетических процессах и образуемое в конце субстратного фосфорилирования:
- а) ПВК
 - б) КДФГ
 - в) рибозо-5-фосфат
 - г) глюкоза
10. К хемосинтетикам не относятся:
- а) нитробактерии
 - б) нитрозобактерии
 - в) железобактерии
 - г) пурпурные серобактерии
11. Фиксация CO_2 не происходит при:
- а) оксигенном фотосинтезе
 - б) аноксигенном фотосинтезе
 - в) гликолизе
 - г) хемосинтезе
12. Происходит только у прокариот:
- а) гликолиз
 - б) КДФГ путь
 - в) ПФ путь
 - г) брожение
13. Источником водорода при фотосинтезе является вода у:
- а) цианобактерий
 - б) пурпурных серобактерий
 - в) пурпурных несерных бактерий
 - г) зеленых серобактерий
14. Гомоферментное и гетероферментное брожение:
- а) молочнокислое
 - б) спиртовое
 - в) маслянокислое
 - г) пропионовокислое
15. С фазой терминации не связан кодон и-РНК:
- а) УАА
 - б) УАГ
 - в) ГУГ
 - г) УГА
16. В цикле Кальвина фиксация CO_2 не происходит у:
- а) фототрофных цианобактерий
 - б) гетеротрофных бактерий
 - в) фототрофных бактерий
 - г) хемотрофных бактерий
17. Наиболее энергетически выгодный путь расщепления глюкозы до ПВК:
- а) гликолиз
 - б) ПФ путь
 - в) КДФГ путь
 - г) энергетической выгоды на этом уровне нет

а) цианобактерии в) бесхлорофильных
серобактерий

б) пурпурных серобактерий г) пурпурных несерных
бактерий

а) брожение
б) окислительное
 фосфорилирование
в) анаэробное дыхание
г) трансляция

а) субстратного фосфорилирования в) брожения
б) окислительного фосфорилирования г) анаэробного дыхания

ские среды могут быть жидкие и плотные и содержат вещества, в отношении которых микробы способны проявлять свою биохимическую (ферментативную) активность. Результат реакции определяется при помощи добавляемых в питательную среду различных индикаторов, дающих цветные реакции, или по появлению визуально определяемых продуктов реакции.

Ниже приведены те физиолого-биохимические признаки, которые, как правило, необходимы для определения систематического положения различных бактерий.

Использование углеводов и сахароспиртов (сахаролитическая активность).

Для установления, какие источники углерода потребляются данной бактерией, в лабораторной практике часто используют среды Гисса с различными сахарами и индикатором. Под действием сахаролитических ферментов бактерий «сахара» расщепляются на альдегиды и органические кислоты. Конечными продуктами их расщепления являются газообразные вещества CO_2 и H_2 . Образование кислот регистрируют по изменению активной кислотности (рН) среды, образование газа – по появлению на поверхности среды пены и вытеснению среды из поплавка (при посеве в жидкую среду) или по пузырькам и разрыву столбика агара (при посеве в полужидкую среду).

Расщепление белков (протеолитическая активность).

Некоторые микроорганизмы продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты – протеазы, катализирующие расщепление белков.

Разжижение желатина. У некоторых бактерий протеолитические ферменты обнаруживаются путем разжижения желатина. Чтобы его обнаружить делают посев культуры уколом в столбик желатина и оставляют посев на несколько суток при комнатной температуре. Различные виды микробов дают характерные для них формы разжижения. Различия роста по уколу определяются потребностью микробов в кислороде.

Пробы на индол, сероводород, аммиак. Разложение микробами белков сопровождается образованием указанных веществ. Для их обнаружения делают посев в пробирки с МПБ с повышенным содержанием пептона (3%) или пептонной водой. Под пробки пробирок помещают узкие полоски фильтровальной бумаги длиной

5-6см, предварительно смоченные индикатором и высушенные. Аммиак, образующийся при дезаминировании аминокислот, вызывает посинение розовой лакмусовой бумажки. Сероводород, образуемый микроорганизмами, способными использовать в процессах метаболизма серосодержащие аминокислоты вызывает образование сульфида свинца и нижний кончик бумажки, пропитанной уксуснокислым свинцом, чернеет. Если микробы обладают способностью образовывать индол из аминокислоты триптофан, то происходит покраснение бумажки, пропитанной 12% раствором щавелевой кислоты.

Выявление каталазы. Некоторые микробы, принадлежащие к группе аэробов, в процессе дыхания образуют перекись водорода, являющуюся клеточным ядом. У них по мере образования перекись разлагается на воду и молекулярный кислород при участии фермента каталазы. Определением наличия каталазы также пользуются при идентификации бактерий, обрабатывая культуру 1-3% раствором перекиси водорода.

Оснащение лабораторного занятия.

Пробирки со скошенным МПА и посевом выделяемой чистой культуры, сделанным студентами.

Пробирки со средами Гисса с глюкозой и сахарозой, пробирки с пептонной водой, пробирки со столбиком желатина, кристаллизаторы, препаратодержатели, предметные и покровные стекла, спиртовки, спички, бактериологические петли и иглы.

Бумажки Синева, капельницы с раствором Люголя, фуксином Пфейффера, 96% этанолом, флаконы с водой, фильтровальная бумага, полоски фильтровальной бумаги, пропитанные раствором уксуснокислого свинца, щавелевой кислоты, полоски лакмусовой бумаги, флаконы с 3% перекисью водорода, пипетки, стеклографы.

Микроскопы, флаконы с иммерсионным маслом, тряпочки для протирания оптики.

Таблица «Биохимическая активность бактерий».

Ход выполняемой работы.

1. Просмотреть посевы на скошенном агаре.
2. Сделать мазок из культуры на скошенном агаре на проверку чистоты культуры, окрасить по Граму.

3. Сделать посев культуры бактериологической петлей на полужидкие среды Гисса с глюкозой и сахарозой на проверку сахаролитической активности.

4. Сделать посев культуры бактериологической иглой уколом в столбик желатина для проверки протеолитической активности.

5. Сделать посев культуры бактериологической петлей в пептонную воду на проверку способности образовывать аммиак, индол, сероводород.

6. Сделать из культуры нативный препарат раздавленная капля и просмотреть под микроскопом с иммерсией и приспущенным конденсором для выявления подвижности бактерий.

7. Провести реакцию на предметном стекле с каплей перекиси водорода, внеся в петлей исследуемую культуру. Наблюдать через 2–3 минуты наличие или отсутствие в объеме капли пузырьков кислорода, выделяющегося при разложении перекиси водорода (капля «закипает»), причем, чем выше ферментативная активность бактерий, тем раньше начинают появляться газовые пузырьки.

8. Данные о морфологии, подвижности, ферментативной активности и реакции на каталазу культуры занести в альбом.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Схема 1. Общая схема энергетического метаболизма
2. Таблица 12. Виды субстратного фосфорилирования у прокариот.

3. Таблица 13. Виды брожения.

4. Таблица 14. Основные виды автотрофного синтеза углеводов.

б) Выучить:

1. Понятие о метаболизме бактерий. Энергетический и пластический обмен.

2. Субстратное фосфорилирование.

3. Брожение, виды брожения.

4. Окислительное фосфорилирование.

5. Анаэробное дыхание, виды.

6. Синтез углеводов, виды.

7. Специфика синтеза аминокислот, липидов и белков у бактерий.

Рабочее задание:

1. Просмотреть посевы бактерий на скошенном агаре.
2. Сделать мазок из культуры на скошенном агаре, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
3. Сделать посевы культуры на проверку сахаролитической и протеолитической активности.
4. Сделать в альбоме рисунок пробирок со средами Гисса, пептонной водой и желатином до посева.
5. Сделать из культуры нативный препарат раздавленная капля для выявления подвижности бактерий, промикроскопировать.
6. Провести реакцию на стекле для выявления каталазной активности.

Содержание альбома:

1. Рис. 5. Посев в среды Гисса на проверку сахаролитической активности
2. Рис.6. Посевы на проверку протеолитической активности.

Пример заполнения альбома

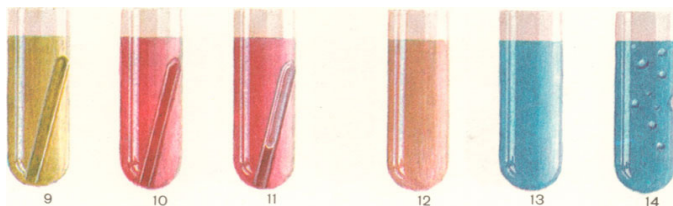


Рис. 5. Посев в среды Гисса на проверку сахаролитической активности
Изменение цвета среды при способности ферментировать соответствующий моносахарид



Рис. 6. Посевы на проверку протеолитической активности

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
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, физиология питания, санитария [Электронный ресурс]: Е.А. Рубина, В.Ф. Малыгина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 240 с.
5. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
6. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>
7. Практикум по микробиологии [Текст]: практикум / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук; под ред.: А. И. Нетрусова. – М., 2005. – 608 с.

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 4.

«Идентификация бактериальной культуры.

Культивирование вирусов»

1. Типы взаимодействия вирусов с клеткой хозяином.
2. Этапы взаимодействия вирусов с клеткой хозяином.
3. Особенности репродукции вирусов.
4. Типы взаимодействия фагов с бактериальными клетками.
5. Особенности взаимодействия фагов с бактериальными клетками.
6. Фаговая конверсия.

Тема 4. ФИЗИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Особенности физиологии вирусов.

Вирусы не имеют своего метаболизма, их физиология всегда связана с живой клеткой. Это касается и вирусов бактерий – фагов. Есть следующие типы взаимодействия вирусов (фагов) с клеткой – хозяином:

1. Продуктивная инфекция – это репродукция вируса при проникновении в клетку, образование новых вирионов и выход их из клетки. Продуктивное взаимодействие «вирус-клетка» чаще носит литический характер, то есть заканчивается гибелью и лизисом инфицированной клетки, что происходит после полной сборки дочерней популяции. Фаги, осуществляющие продуктивное взаимодействие называются вирулентными.

2. Абортивная инфекция – внезапное прерывание репродукции вируса на каком-либо этапе. Абортивное взаимодействие не приводит к появлению дочерней популяции и происходит при взаимодействии вируса с покоящейся клеткой либо при инфицировании клетки вирусом с изменёнными (дефектными) свойствами.

3. Интегративная инфекция – вирогения (редуктивная инфекция в случае фагов) – это встраивание поступившей в клетку-хозяина вирусной НК в ДНК клетки (образование провируса или профага). Интегративное взаимодействие не приводит к гибели клетки. Нуклеиновая кислота вируса, встроившись в геном клетки-хозяина, в последующем функционирует как его составная часть. Наиболее яркий пример подобного взаимодействия – лизогенизация бактериальных клеток. Фаги, делающие клетку лизогенной, называются умеренными. С их участием происходит фаговая конверсия – приобретение бактериями новых фенотипических признаков за счет изменения наследственного материала с помощью фага в процессе трансдукции (см. тему «Генетика микроорганизмов»).

2. Этапы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином в продуктивном типе.

При полном развитии вируса в клетке процессы проходят 6 этапов.

1. Адсорбция вириона на поверхности инфицируемой клетки. Адсорбция происходит путём взаимодействия вириона со специфическими клеточными рецепторами. Прикрепление вируса возможно за счет рецепторного соответствия. За распознавание рецепторов ответственны белки, входящие в состав капсида либо суперкапсида. Обычно животная клетка содержит около 50 000 рецепторов, и её заражение носит множественный характер, то есть на клетке может сорбироваться большое количество вирионов. Тем не менее, инфицированная вирусом клетка обычно толерантна к повторному заражению гомологичным вирусом.

2. Проникновение вируса в клетку. Простые вирусы проникают в клетку путём эндоцитоза – погружения участка клеточной мембраны в месте их адсорбции. Иначе этот процесс известен как виропексис (эндоцитоз, опосредованный рецепторами). Сложные вирусы проникают в клетку путём слияния суперкапсида с клеточной мембраной при участии специфических F-белков (белков слияния). Фаги растворяют клеточную стенку бактерии, и впрыскивают свою НК (оболочка фага остается снаружи бактериальной клетки).

3. Раздевание вируса. После проникновения вирусов в цитоплазму происходит частичная депротеинизация вирионов клеточными протеазами и модификация их нуклеопротеида. Особенностью взаимодействия фага с бактериальной клеткой является отсутствие этапа «раздевания», поскольку фаговая нуклеиновая кислота поступает в клетку, а капсид остается снаружи.

4. Репродукция вируса – транскрипция и трансляция вирусной информации и репликация вирусного генома с использованием клеточных белоксинтезирующей системы и системы генерации энергии.

5. Морфогенез – сборка вирусов. Самосборка вирионов идет за счет способности вирусных белков и НК, накопившихся в достаточном (критическом) количестве в клетке – хозяине, узнавать и спонтанно соединяться друг с другом. У просто устроенных вирусов, состоящих из нуклеиновой кислоты и нескольких белков, сборка состоит из упорядоченного взаимодействия этих молекул. У сложно устроенных вирусов сборка дочерних популяций протекает многоступенчато. Взаимодействие нуклеиновых кислот с внутренними и оболочечными белками приводит к образованию нуклеокапсидов, или сердцевин.

6. Высвобождение дочерних вирионов – конечная стадия репродуктивного цикла. Сложные вирусы выходят «почкованием», приобретая суперкапсид из ЦПМ или ядерной мембраны (клетка некоторое время еще живет). Простые вирусы – «взрывом» клетки – одномоментным выходом вирионов и лизисом клетки (клетка гибнет). Фаги высвобождаются из клетки только «взрывом» или «просачиванием» через оболочку клетки, «почкования» у них нет.

3. Образование вирусных частиц

Образование дочерних вирусных частиц – репродукция в заражённой клетке подразумевает необходимость трёх процессов:

1) экспрессия генетического материала в виде его транскрипции и последующей трансляции, что приводит к появлению вирусных белков;

2) синтез генетического материала вируса (репликация);

3) сборка из генетического материала и вирусных белков дочерних популяций.

Генетическим материалом вирионов может быть либо ДНК, либо РНК.

Транскрипция «+»РНК-содержащих вирусов. Функции и-РНК выполняет геном вируса («+»РНК), поэтому у таких вирусов для синтеза вирусных белков (трансляция) нет необходимости в процессе транскрипции. Другими словами, у «+»РНК-содержащих вирусов транскрипция отсутствует.

Транскрипция «-» РНК-содержащих вирусов и вирусов, имеющие две нити РНК. Функции и-РНК выполняют транскрипты, комплементарные «-»РНК вириона. Поэтому у таких вирусов транскрипция существует как самостоятельный этап репродуктивного цикла. Для образования транскриптов в составе вирионов имеется собственная РНК-полимераза (транскриптаза).

Транскрипция ДНК-вирусов. Транскрипция у них – самостоятельный этап репродуктивного цикла, так как геном ДНК-вирусов должен транскрибироваться для образования и-РНК. Вирусы, репродуцирующиеся в ядре (например, герпес- и аденовирусы) для этой цели используют клеточную ДНК-зависимую РНК-полимеразу (транскриптазу). Вирусы, репродуцирующиеся в цитоплазме (например, поксвирусы) лишены такой способности и содержат (как и вирусы с «-»РНК) собственную транскриптазу.

На стадии трансляции происходит связывание и-РНК и инициация трансляции, при этом идет «дискриминация» клеточных и-РНК, и синтетические процессы на рибосомах переходят под вирусный контроль.

В целом у двунитевая ДНК-геномных вирусов реализация генетической информации идет по схемам: ДНК → и-РНК → белок, или ДНК → РНК (прегеном) → и-РНК → белок, или ДНК → РНК (прегеном) → «-»ДНК (с участием фермента вирусная РНК-зависимая ДНК-полимераза – обратная транскриптаза) → «+»ДНК. У одноститевая ДНК-геномных вирусов – по схеме: ДНК → «-»ДНК → «+»ДНК → и-РНК → белок. У одноститевую «+»РНК-содержащих вирусов сама эта РНК является и-РНК, поэтому схема: «+» РНК → белок. В случае «-»РНК схема: «-» РНК → и-РНК → белок. Иногда одноститевые РНК являются матрицей для ДНК, тогда схема реализации генетической информации: РНК → «-»ДНК → «+»ДНК → и-РНК → белок. В этом случае также работает обратная транскрипция. Двунитевая РНК-геномные вирусы осуществляют схему: РНК → и-РНК → белок.

Репликация – образование дочерних копий геномов протекает по-разному в зависимости от типа генетического материала (ДНК или РНК).

Репликация вирусных ДНК принципиально сходна с репликацией клеточных ДНК. Репликацию РНК-геномных вирусов осуществляют вирусные РНК-зависимые РНК-полимеразы (репликазы). Исключение составляют ретровирусы, их «+»РНК служит матрицей для синтеза ДНК. Синтез ДНК на матрице РНК осуществляет обратная транскриптаза, необходимая для переписывания информации с РНК на ДНК. Синтезируемая вирусная ДНК может интегрироваться в клеточный геном в форме ДНК-провируса. Репликация одноститевых РНК вирусов протекает в два этапа: первый включает образование матрицы, комплементарной геному; второй – образование копий РНК с этой матрицы. Репликация двунитевых РНК вирусов идет как репликация ДНК.

4. Культивирование вирусов.

Вирусы не культивируются даже на самых сложных питательных средах, т.к. для их репродукции нужны живые клетки. Это культивирование в организме экспериментальных животных,

развивающихся куриных эмбрионах и культурах тканей (чаще используются эмбриональные ткани или опухолевые клетки).

Восприимчивые животные (мышы-сосиски и др.) заражаются путем введения материала подкожно, внутривенно, внутримышечно и т.д. Развитие вирусов оценивается по гибели животного, характеру патологического процесса и на основании гистологического исследования.

Куриным эмбрионам (7-12 дневным) вводят материал в аллантоисную полость, в амниотическую полость, на хорион-аллантоисную оболочку, в желточный мешок. Оценивают фокусные поражения на оболочках (геморрагии, «оспины»), гибель эмбриона, гемагглютинацию (склеивание эритроцитов).

Культура тканей – основной метод. Для выращивания клеток тканевых культур используют многокомпонентные питательные среды (среда 199, среда Игла и др.). Культуры тканей необходимо периодически пересаживать на свежую среду. По количеству пассажей, выдерживаемых растущей культурой тканей, среди них различают: первичные (первично-трипсинизированные), которые выдерживают не более 5–10 пассажей; полуперевиваемые, которые поддерживаются не более, чем в 100 генерациях; перевиваемые культуры тканей, которые поддерживаются в течение неопределенно длительного срока в многочисленных генерациях.

Чаще всего используются однослойные первично-перевиваемые и перевиваемые тканевые культуры. Индикация вирусов проводится по ЦПД (цитопатическому действию). Это видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (вплоть до их отторжения от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов. Например, используется метод «цветная проба» – сравнение эффектов изменения цвета индикатора в питательной среде из-за ее закисления продуктами метаболизма живых клеток при отсутствии вируса и сохранения цвета индикатора при накоплении вирусов и гибели клеток в культуре.

Для культивирования фагов используются бактериальные культуры. Оценка их репродукции проводится по просветлению бактериальной суспензии.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 15. Типы взаимодействия вирусов с клеткой – хозяином

Тип взаимодействия	Результат взаимодействия
Продуктивная инфекция	Образование новых вирионов
Абортивная инфекция	Прерывание репродукции вируса
Вирогения (образование провируса)	Интеграция вирусной НК в ДНК клетки хозяина

Таблица 16. Этапы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином в продуктивном типе

Этап	Основные события
Адсорбция	Прикрепление вируса к клетке за счет рецепторного соответствия
Проникновение вируса в клетку	Виропексис (эндоцитоз, опосредованный рецепторами)
Раздевание вируса	Депротенинизация вируса клеточными протеазами
Репродукция вируса	Транскрипция и трансляция вирусной информации и репликация вирусного генома с использованием клеточных белоксинтезирующей системы и системы генерации энергии.
Морфогенез	Самосборка вирионов за счет способности вирусных белков и НК, накопившихся в достаточном количестве в клетке – хозяине, узнавать и спонтанно соединяться друг с другом.
Выход вирусных частиц	1. Сложные вирусы – «почкованием», приобретая суперкапсид из ЦПМ или ядерной мембраны (клетка некоторое время еще живет) 2. Простые вирусы – «взрыв» клетки – одномоментный выход вирионов (клетка гибнет).

Таблица 17. Основные схемы реализации вирусной информации

Тип генома		Функция геномной нуклеиновой кислоты	Схема
Однонитевая	«+» нить	Является и-РНК	«+» РНК→ белок
	«-» нить	Матрица для и-РНК	«-» РНК →и-РНК→ белок
	РНК	Матрица для ДНК	РНК→«-»ДНК→«+»ДНК→и-РНК→белок (обратная транскрипция)
Двунитевая РНК		Матрица для и-РНК	РНК →и-РНК →белок
Однонитевая ДНК		Матрица для промежуточной репликативной формы ДНК	ДНК→«-»ДНК→«+»ДНК→и-РНК→белок
Двунитевая ДНК		1. Матрица для и-РНК 2. Матрица для пре-геномной РНК	ДНК →и-РНК →белок ДНК→РНК(прегеном)→и-РНК→белок ДНК→РНК(прегеном)→«-»ДНК→«+»ДНК (обратная транскрипция)

Таблица 18. Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой

Форма взаимодействия	Тип фага	Результат взаимодействия
Продуктивная	вирулентный	Репродукция фага, гибель клетки
Редуктивная	умеренный	Превращение фага в профаг, лизогенизация клетки, возможна фаговая конверсия (приобретение клеткой новых свойств)
Абортивная	вирулентный	Прерывание репродукции, гибель фага

Таблица 19. Этапы взаимодействия фага с бактериальной клеткой в продуктивном типе

Этап	Основные процессы
Адсорбция	Прикрепление к поверхности клетки за счет фагового рецептора (белка-лоцмана)
Проникновение фагового генома	Растворение клеточной стенки бактерии, впрыскивание фаговой НК (оболочка фага остается снаружи бактериальной клетки)
Установление фагового генома и репродукция	С помощью белка-лоцмана геном фага связывается либо с репликативным аппаратом бактерии (ДНК-фаги), либо с транскрипционным аппаратом бактерии (ДНК-фаги), либо с трансляционным аппаратом бактерии («+» РНК фаги), далее – репликация НК фага и синтез фаговых белков
Морфогенез	Самосборка
Выход	«Взрыв» или «просачивание» через оболочку клетки

Таблица 20. Методы культивирования вирусов

Метод	Способ заражения	Индикация вирусов по признакам
Культуры клеток (первичнотрипсинизированные, перевиваемые, полуперевиваемые)	Внесение материала в пробирки с монослоем клеток	1. Специфическая дегенерация клеток (ЦПД) 2. Внутриклеточные включения 3. Гемадсорбция (адсорбция эритроцитов) 4. Гемагглютинация (склеивание эритроцитов) 5. Иммунофлуоресценция (свечение с антивирусными антителами, связанными с флуорохромами) 6. Бляшкообразование (негативные колонии на культуре клеток) 7. «Цветная» проба (закисление среды живыми клетками, изменение цвета индикатора)

Метод	Способ заражения	Индикация вирусов по признакам
Куриные эмбрионы (7–12 дневные)	Введение материала: 1. В аллантоисную полость 2. В амниотическую полость 3. На хорион-аллантоисную оболочку 4. В желточный мешок	1. Фокусные поражения на оболочках (геморрагии, «оспины») 2. Гибель эмбриона 3. Гемагглютинация (склеивание эритроцитов)
Организм восприимчивого животного (мышы-сосиски и др.)	1. Подкожный 2. Внутрикoжный 3. Внутримышечный 4. Внутриветрoбный 5. Субдуральный 6. Интрацеребральный	1. Гибель животного 2. Характер патологического процесса 3. Гистологическое исследование

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Физиология вирусов

1. У одноклеточных ДНК-содержащих вирусов нет фермента репродукции:

- а) ДНК полимеразы
- б) РНК полимеразы
- в) обратной транскриптазы

2. Внезапное прерывание взаимодействия вируса с клеткой хозяином на стадии репродукции – это:

- а) abortивный тип
- б) продуктивный тип
- в) виогения
- г) интегративный тип

3. Для культивирования вирусов не применяются:

- а) чувствительные животные
- б) культура клеток
- в) сложные питательные среды
- г) куриный эмбрион

4. У фагов отсутствует этап взаимодействия с клеткой хозяином:

- а) адсорбция
- б) репродукция
- в) депротенинизация
- г) самосборка вирусов

5. Лизогенной становится клетка при типе взаимодействия:

- а) продуктивном
- б) интегративном
- в) abortивном

6. Продуктивный тип инфекции вызывают фаги:

- а) вирулентные
- б) умеренные
- в) профаги
- г) провирусы.

7. Основной метод культивирования вирусов:
- а) культура клеток
 - б) чувствительное животное
 - в) куриный эмбрион
 - г) питательная среда
8. Вирогения – это тип взаимодействия вируса с клеткой хозяином:
- а) абортивный
 - б) продуктивный
 - в) интегративный
 - г) адсорбция
9. За счет рецепторного соответствия проходит этап взаимодействия вируса с клеткой хозяином в продуктивном типе:
- а) депротенинизация
 - б) репродукция
 - в) самосборка вирионов
 - г) адсорбция
10. Геномная нуклеиновая кислота, которая сама может служить информационной:
- а) « – » РНК
 - б) « + » РНК
 - в) ДНК
 - г) ревертаза (обратная транскриптаза)
11. Проникновение вируса в клетку хозяина, репродукция и выход новых вирионов – это тип:
- а) продуктивный
 - б) интегративный
 - в) абортивный
 - г) вирогения
12. Выход сложных вирусов из клетки хозяина происходит путем:
- а) виropексиса
 - б) «почкования»
 - в) взрыва
 - г) интеграции
13. Для культивирования фагов используют:
- а) культуру клеток
 - б) чувствительное животное
 - в) куриный эмбрион
 - г) бактериальную культуру
14. Провирус образуется при типе вирусной инфекции:
- а) продуктивном
 - б) интегративном
 - в) абортивном
15. Фаговая конверсия может быть при типе взаимодействия:
- а) продуктивном
 - б) интегративном
 - в) абортивном
 - г) адсорбции
16. При накоплении критического количества вирусных компонентов в клетке хозяина происходит:
- а) депротенинизация
 - б) самосборка
 - в) репродукция
 - г) вирогения
17. У фагов нет способа выхода из зараженной клетки при продуктивном типе:

а) виropексиса

в) взрыва

б) «почкования»

г) депроитенизации

18. Репродукция вируса идет по схеме РНК – РНК – белок у:

а) ДНК- содержащих вирусов

в) ДНК- содержащих фагов

б) « + » РНК- содержащих
вирусов

г) «-» РНК- содержащих
вирусов

19. Лизогенизация клетки связана с:

а) продуктивным типом

в) виpогенией

б) абoртивным типом

г) раздеванием вируса

20. «Цветная проба» используется для индикации размножения вируса при культивировании:

а) в культуре клеток

в) в курином эмбрионе

б) в чувствительном животном

г) бактериальной культуре

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 4.

Идентификация бактериальной культуры.

Культивирование вирусов

Цель лабораторного занятия:

1. Научить студентов проводить идентификацию бактериальной культуры с использованием определителей.

2. Изучить основные способы культивирования вирусов.

Описательная часть лабораторного занятия.

Когда все морфологические, культурные и физиологические признаки изучены, то приступают к определению видовой принадлежности исследуемой бактерии. Определение вида осуществляется по определителям. Наиболее распространенными являются определитель бактерий Берги.

Культивирование вирусов имеет специфические особенности по сравнению с культивированием бактерий. Это связано с тем, что вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами и поэтому не могут расти даже на самых сложных питательных средах. Для их репродукции необходима живая клетка. Поэтому для культивирования вирусов используют 3 основных метода:

- заражение чувствительных лабораторных животных;
- заражение развивающегося куриного эмбриона;
- заражение культуры клеток.

Для культивирования бактериофагов (вирусов бактерий) используют чувствительные бактериальные культуры.

Выделение вирусов на лабораторных животных проводят, заражая в основном мышей-сосунков 1-4 дневного возраста и молодых мышей внутрибрюшинно, подкожно или в мозг. При размножении вируса в организме животного развивается характерная клиническая и гистологическая картина заболевания (например, некроз печени, мышцы сердца и т.п.).

Выделение вирусов на курином эмбрионе, используя оплодотворенные яйца 7–12 дневного возраста. Заражают путем нанесения на хорионаллантоисную оболочку, введения в аллантоисную, или амниотическую полость, или в желточный мешок в строго асептических условиях. После инкубации в термостате зародышевые оболочки извлекают и рассматривают на темном фоне характер фокусных поражений.

Выделение вирусов в культуре клеток. Метод получил наибольшее практическое применение. Чаще всего используют однослойные культуры первично трипсинизированных и перевиваемых линий клеток нормальных и злокачественных тканей. Трипсинизированные клетки помещают в питательную среду сложного состава (среда Игла, среда 199 и др.). Периодически часть клеток культуры каждые 4-7 дней пересевают (пассируют) в свежую питательную среду. После 30-60 минут контакта вируса с клетками в пробирку вносят небольшое (1-1,5 мл) количество поддерживающей безбелковой среды. Индикатором наличия вируса в зараженных культурах клеток может служить: специфическая дегенерация клеток культуры, цитопатическое действия (ЦПД, обнаружение под микроскопом внутриклеточных включений, цветная проба при выращивании культуры клеток на питательной среде с индикатором, положительные реакции гемагглютинации (склеивание эритроцитов) или гемадсорбции (приклеивание эритроцитов к поверхности клеток культуры).

Сходным образом культивируют некоторых бактерий, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами, а именно риккетсий и хламидий.

Культивирование фагов. Материалом, из которого выделяют фаг, обычно являются фильтраты, полученные с помощью бактериальных фильтров из объектов внешней среды. Выращивание производят при оптимальной температуре для данной культуры бактерий в течение 18-24 часов. После этого жидкость фильтруют сначала через бумажный, а затем через бактериальный фильтры. Полученный фильтрат испытывают на наличие фага по лизису чувствительной к нему бактериальной культуры (тест – культуры). Количественный учет основан на лизисе чувствительных микробных клеток каждой частицей фага. Активность фага выражают понятием титр, различая титр фага в жидкой среде и на плотной среде. При исследовании в жидкой среде (по Аппельману) титр фага – это наибольшее его разведение или наименьшее количество, которое подавляет рост тест-культуры в условиях данного опыта. На плотной среде (по Грация) титр фага – количество частиц фага в 1 мл исходного материала. Метод Грация основан на том, что каждая частица фага дает зону просветления (лизиса) на чашке с газоном чувствительного к нему микроба, т.е. образует отдельную «негативную» колонию. Подсчитав количество негативных колоний на чашке, определяют титр фага.

Оснащение лабораторного занятия.

Пробирки с посевами бактерий в среды Гисса, в пептонную воду и столбик желатина, сделанные студентами на предыдущем занятии; пробирки с фильтратом воды, содержащим фаг; пробирки с тест-культурами.

Чашки Петри с пластинками МПА. Штативы с пробирками с 4,5 мл стерильного МПБ. Стерильные пипетки объемом 1–2 мл, стеклографы, определитель бактерий Берги.

Таблицы «Негативные колонии фага», схема строения 12-дневного куриного эмбриона.

Ход выполняемой работы.

1. Просмотреть пробирки с посевами идентифицируемой культуры бактерий в среды Гисса, в пептонную воду и столбик желатина, учесть результаты.

2. С помощью определителя бактерий Берги провести идентификацию выделенной культуры бактерий на основе изученных морфологических, культуральных и биохимических признаков.

3. Заложить опыт по исследованию воздуха на содержание фага, для чего выполнить следующие действия.

а) чашки Петри с 1,5 % МПА засевают «газонами» культурой, для которой ищут фаг;

б) открытые чашки со свежеприготовленными посевами культуры выставляют на 20-30 мин, затем, закрывают крышками и переносят в термостат на 24-48 часов.

Наличие в воздухе фага обнаруживают по появлению на поверхности газона в чашке Петри отдельных стерильных пятен.

4. Заложить опыт по титрованию фага в жидкой среде по Апфельману. Для этого выполнить следующую последовательность действий:

- взять 8 пробирок с 4,5 мл МПБ, пронумеровать их от 1 до 7, 8-ю пробирку обозначить буквой К;

- в первую пробирку внести пипеткой 0,5 мл фильтрата с фагом, перемешать;

- из первой пробирки набрать пипеткой 0,5 мл бульона с фагом, перенести во вторую пробирку, далее также приготовить последовательные разведения фага, уменьшая его концентрацию в 10 раз;

- из 7-й пробирки после внесения в нее 0,5 мл бульона из 6-ой пробирки и перемешивания 0,5 мл жидкости выливают в дезинфицирующий раствор для выравнивания объемов жидкости в пробирках;

- в пробирку, обозначенную буквой К фаг не вносить;

- внести во все пробирки стерильной пипеткой по 1 капле суточной тест-культуры;

- поместить пробирки в штатив и поставить на сутки в термостат;

- после инкубации, в течение которой происходит размножение бактерий (вызывающее помутнение бульона), и их взаимодействие с фагом (которое заканчивается лизисом бактериальных клеток) определить титр фага по тому последнему разведению, которое дало лизис бактерий, т.е. по просветлению бульона в последней пробирке с соответствующей пометкой разведения фага;

отметить отсутствие лизиса в контрольной пробирке, куда фаг не вносился;

– результаты исследования внести в таблицу 21, сделать заключение о титре фага.

Таблица 21. Титрование фага по Апфельману

Разведение фага в МПБ + Тест – культура бактерий	К	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Учет по лизису бактерий (просветление бактериальной суспензии)								

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 15. Типы взаимодействия вирусов с клеткой – хозяином.
2. Таблица 16. Этапы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином в продуктивном типе.
3. Таблица 17. Основные схемы реализации вирусной информации.
4. Таблица 18. Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой.
5. Таблица 19. Этапы взаимодействия фага с бактериальной клеткой в продуктивном типе.

6. Таблица 20. Методы культивирования вирусов

б) Выучить:

1. Типы взаимодействия вирусов с клеткой хозяином.
2. Этапы взаимодействия вирусов с клеткой хозяином.
3. Особенности репродукции вирусов.
4. Типы взаимодействия фагов с бактериальными клетками.
5. Особенности взаимодействия фагов с бактериальными клетками.
6. Фаговая конверсия.

Рабочее задание:

1. Учесть результаты посевов на проверку биохимической активности культуры бактерий и провести ее идентификацию по описанным признакам
2. Заложить опыт по исследованию воздуха на содержание фага.

3. Проанализировать результаты опыта по титрованию фага в жидкой среде по Аппельману.

4. По результатам опыта заполнить таблицу и определить титр фага.

5. Сделать заключение, чему равен титр фага.

6. Ознакомиться со способами заражения куриного эмбриона вирусным материалом.

Содержание альбома:

1. Таблица. Титрование фага по Аппельману

2. Рис. 7. Способы заражения куриного эмбриона

3. Рис. 8. Негативные колонии бактериофага.

Пример заполнения альбома

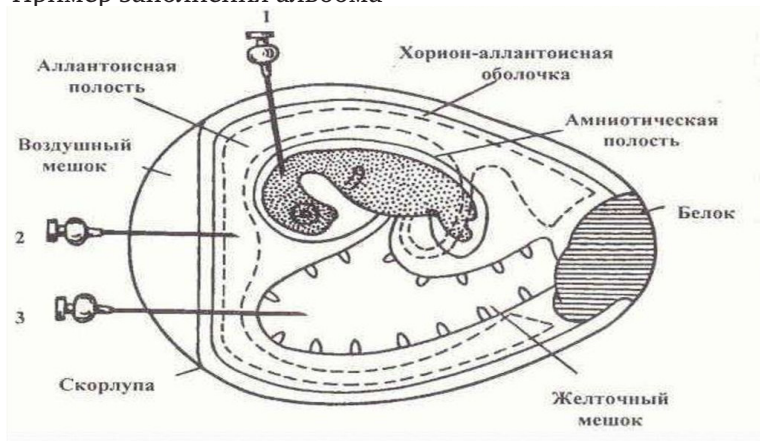


Рис. 7. Способы заражения куриного эмбриона

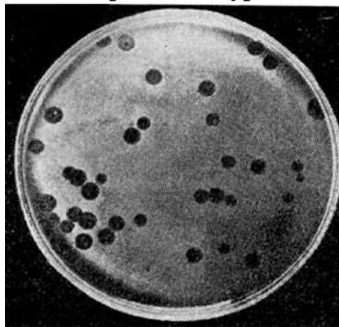


Рис. 8. Негативные колонии фага (стерильные пятна, бляшки) на бактериальном газоне, просмотр на темном фоне. Увел. 1 : 1

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
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. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С. А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с. (<http://www.bibliorossica.com>)
5. Овчарова Е. Н. Биология (растения, грибы, бактерии, вирусы) [Электронный ресурс]: учебное пособие для поступающих в вузы / Е.Н. Овчарова, В.В. Елина. – М.: ИНФРА-М, 2013. – 704с.
6. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
7. Шапиро Я. С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы [Текст]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро. – М, 2003. – 323 с.
8. ibooks.ru [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://ibooks.ru>
9. Znanium.com [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://znanium.com>

Вопросы для самоподготовки к лабораторной работе № 5.

«Методы изучения рекомбинации у бактерий»

1. Наследственность у прокариот.
2. Виды изменчивости у прокариот.
3. Виды мутаций у прокариот.
4. Виды рекомбинаций у прокариот (трансформация, трансдукция, конъюгация).
5. Особенности генетики вирусов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Наследственность прокариот.

Наследственный аппарат бактерий и возможности его изучения имеют ряд особенностей. Бактерии – гаплоидные организмы, т. е. они имеют 1 «хромосому», а значит при наследовании признаков отсутствует явление доминантности. Кроме того, бактерии обладают высокой скоростью размножения, в связи с чем за короткий промежуток времени (сутки) сменяется несколько десятков поколений бактерий. Поэтому могут встречаться клетки с 2, 4 одинаковыми хромосомами, образовавшимися за счет быстро повторяющейся репликации.

Хромосома бактерий – это молекула ДНК. Длина этой молекулы достигает 1,0 мм и, чтобы «уместиться» в бактериальной клетке, она не линейная, как у эукариотов, а суперспирализована в петли и свернута в кольцо. Это кольцо в одной точке прикреплено к цитоплазматической мембране. На бактериальной хромосоме располагаются отдельные гены. У кишечной палочки, например, их более 2 тыс.

Почти все гены, необходимые для жизнедеятельности и определяющие видовую специфичность, расположены у бактерий в основном в этой единственной ковалентно замкнутой молекуле ДНК. Для обозначения бактериальных хромосом, чтобы подчеркнуть их отличия от эукариотических, используют термин нуклеоид. Область, где локализована хромосома, называется генофор (англ. *genophore*)) и не окружена мембраной. В связи с этим новосинтезированная мРНК сразу доступна для связывания с рибосомами, а транскрипция и трансляция сопряжены.

В целом генотип (геном) бактерий представлен не только хромосомными генами. Функциональными единицами генома бактерий, кроме хромосомных генов, являются:

- IS-последовательности;
- транспозоны;
- плазмиды.

IS-последовательности – короткие фрагменты ДНК. Они не несут структурных (кодирующих тот или иной белок) генов, а содер-

жат только гены, ответственные за транспозицию (способность IS-последовательностей перемещаться по хромосоме и встраиваться в различные ее участки). IS-последовательности одинаковы у разных бактерий.

Транспозоны – это молекулы ДНК, более крупные, чем IS-последовательности. Помимо генов, ответственных за транспозицию, они содержат и 1 структурный ген, кодирующий тот или иной бактериальный признак.

IS-последовательности и транспозоны легко перемещаются по хромосоме. Их положение сказывается на экспрессии как их собственных структурных генов, так и соседних хромосомных.

Плазмиды – кольцевые суперспиралевидные молекулы двуниевой ДНК. Их молекулярная масса колеблется в широких пределах и может быть в сотни раз больше, чем у транспозонов. Эти молекулы ДНК имеют меньшую, чем хромосома бактерий молекулярную массу. Они несут наследственную информацию, не являющуюся жизненно необходимой для микробной клетки, но обеспечивающую ей те или иные селективные преимущества в окружающей среде. Наиболее известны плазмиды:

F-плазмиды, обеспечивающие конъюгационный перенос между бактериями;

R-плазмиды – плазмиды лекарственной устойчивости, обеспечивающие циркуляцию среди бактерий генов, детерминирующих устойчивость к используемым для лечения различных заболеваний химиотерапевтическим средствам;

Плазмиды биodeградации, дающие возможность разрушать тот или иной субстрат;

Col-плазмиды, отвечающие за способность синтезировать колицины;

Hly-плазмиды, обеспечивающие синтез гемолизина;

Tox-плазмиды, обеспечивающие синтез токсинов и т. д.

Плазмиды могут быть интегрированы в хромосому (в отличие от IS-последовательностей и транспозонов, встраиваются в строго определенные участки), а могут существовать автономно. В этом случае они обладают способностью к автономной репликации, и именно поэтому в клетке может быть 2, 4, 8 копий такой плазмиды.

Многие плазмиды имеют в своем составе гены трансмиссивности и способны передаваться от одной клетки к другой при конъю-

югации (обмене генетической информацией). Такие плазмиды называются трансмиссивными.

Особую роль играют F-плазмиды (фактор фертильности, половой фактор). Они придают бактериям функции донора, и такие клетки способны передавать свою генетическую информацию другим, F- клеткам (т.е. клеткам, не имеющим F-плазмиды). Можно условно сказать, что наличие F-плазмиды является фенотипическим выражением пола у бактерий. С F-плазмидой связана не только донорская функция, но и некоторые другие фенотипические признаки – наличие F-пилей (половых ресничек) и чувствительность к некоторым фагам. С помощью пилей устанавливается контакт между донорскими и реципиентными клетками. Через их канал и передается донорская ДНК при рекомбинации. На половых ресничках расположены рецепторы для фагов. F-клетки не имеют таких рецепторов и нечувствительны к таким фагам.

2. Изменчивость прокариот.

У прокариот различают 2 вида изменчивости – фенотипическую и генотипическую.

Фенотипическая изменчивость – модификация – не затрагивает генотип, но затрагивает большинство особей популяции. Модификации не передаются по наследству и с течением времени затухают, т. е. возвращаются к исходному фенотипу через большее (длительные модификации) или меньшее (кратковременные модификации) число поколений. Они носят адаптивный характер.

Генотипическая изменчивость затрагивает генотип. В ее основе лежат мутации и рекомбинации.

Мутации бактерий принципиально не отличаются от мутаций эукариотических клеток. Особенностью мутаций у бактерий является относительная легкость их выявления, так как имеется возможность работать с большими по численности популяциями бактерий. По происхождению мутации могут быть спонтанными и индуцированными. По протяженности (числу мутировавших генов или характеру изменений в первичной структуре ДНК) – точковыми (генными) и хромосомными. По направленности (фенотипическим последствиям) – прямыми и обратными. По фенотипическим проявлениям – морфологические (утрата капсулы, клеточной стенки, жгутиков), биохимические (ауксотрофность, резистент-

ность к ядам и др.), культуральные (S – R диссоциация – переход гладких колоний в шероховатые). По влиянию на жизнедеятельность – летальные (приводят к гибели), условно-летальные (гибель при определенных условиях, например у температурочувствительных мутантов) и нейтральные (не влияют на жизнедеятельность).

Рекомбинации (обмен генетическим материалом) у прокариот отличаются от рекомбинаций у эукариот: Однако главнейшее событие, а именно обмен генетическим материалом, происходит и в этом случае. Этот называется генетической рекомбинацией. Часть ДНК (очень редко вся ДНК) клетки-донора переносится в клетку-реципиент, ДНК которой генетически отличается от ДНК донора. При этом перенесённая ДНК замещает часть ДНК реципиента. В процессе замещения ДНК участвуют ферменты, расщепляющие и вновь соединяющие цепи ДНК. При этом образуется ДНК, которая содержит гены обеих клеток. Такую ДНК называют рекомбинантной. При рекомбинациях у бактерий образуется не зигота, как у эукариот, а мерозигота (несет полностью генетическую информацию реципиента и часть генетической информации донора в виде дополнения). У бактериальной клетки-рекомбината изменяется не только качество, но и количество генетической информации.

Известны 3 механизма рекомбинации. Это – в порядке их открытия – трансформация, конъюгация и трансдукция.

Трансформация – это обмен генетической информацией у прокариот путем введения в бактериальную клетку-реципиент изолированной ДНК из клетки донора. При трансформации передаются единичные (чаще 1) признаки. Для восприятия донорской ДНК при трансформации клетка-реципиент должна находиться в определенном физиологическом состоянии (компетентности). В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок (фактор компетентности), активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку. В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. Возможно искусственное приведение клеток в состояние компетентности. Для этого применяют среды с высоким содержанием ионов кальция, цезия, рубидия, электропорацию или заменяют клетки реципиента про-

топластами без клеточных стенок. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста.

ДНК необратимо адсорбируются на ДНК-связывающем белке, после чего одна из нитей разрезается эндонуклеазой на фрагменты длиной 2–4 тыс. пар оснований и проникает в клетку, вторая полностью разрушается. В случае, если эти фрагменты имеют высокую степень гомологии с какими-либо участками бактериальной хромосомы, возможна замена этих участков на них. Поэтому эффективность трансформации зависит от эволюционного расстояния между донором и реципиентом. Общее время процесса не превышает нескольких минут. Впоследствии, при делении, в одну дочернюю клетку попадает ДНК, построенная на основе исходной нити ДНК, в другую – на основе нити с включённым чужеродным фрагментом (выщепление).

Конъюгация (от лат. *conjunctio* – соединение), парасексуальный процесс – однонаправленный перенос части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток. Открыт в 1946 году Дж. Ледербергом и Э. Тайтемом. Имеет большое значение в природе, поскольку способствует обмену полезными признаками при отсутствии истинного полового процесса. Из всех процессов горизонтального переноса генов конъюгация позволяет передавать наибольшее количество генетической информации.

Для успешного установления контакта двух клеток в клетке-доноре должна присутствовать конъюгативная (половая, трансмиссивная) плазида. Первой из них была открыта F-плазида: эписома (способная встраиваться в бактериальную хромосому), длиной около 100 тыс. пар оснований. Плазида несёт гены, кодирующие ряд функций. Одна из них – образование половых пилей (*sex* – пилей), отвечающих за прикрепление к клетке-реципиенту. Такие донорные клетки называются F⁺-клетки, а реципиентные – F⁻.

Конъюгативные плазмиды также кодируют белки, противодействующие прикреплению пилей других бактерий к клеточной стенке данной. Поэтому клетки, уже содержащие трансмиссивные плазмиды, на несколько порядков реже выступают в роли реципиентов при конъюгации.

Плазмидой кодируется эндонуклеаза, разрезающая одну из нитей её ДНК в определённой точке (*ori*). Затем разрезанная цепь раскручивается и 5'-концом переносится в клетку-реципиент. Выдвигались предположения, что ДНК передаётся по каналам в половых пилях, или перенос идёт через поры в клеточной стенке. В первом сегменте поступающей в клетку реципиента нити ДНК расположены антирестрикционные гены. Эти гены должны транскрибироваться в реципиенте сразу же после своего поступления туда, чтобы обеспечить накопление белков, блокирующих процесс разрушения ДНК рестриктазами. Наконец, переданная цепь замыкается в кольцо и на её основе восстанавливается двунитевая структура ДНК плазмиды. Весь процесс длится несколько минут. При этом, F⁻-клетки превращаются в F⁺-клетки.

Конъюгативная плаزمида может встраиваться в хромосому путём гомологичной рекомбинации с участием IS-элементов. Конъюгация при этом идёт по тому же механизму, однако реципиенту передаётся не только плазмида, но и хромосомный материал донора. Такие клетки называются Hfr (высокая частота рекомбинации). В этом случае процесс затягивается на часы, часто происходит разрыв передаваемой нити ДНК. Путём искусственного прекращения передачи ДНК в разное время и наблюдения за тем, какие гены были при этом переданы, была получена карта хромосомы кишечной палочки (*E. coli*) и показано её кольцевое строение.

При выщеплении из хромосомы плазмида может захватывать её фрагмент и переносить его с собой в другую клетку (аналогия с трансдукцией). Такие клетки обозначаются – F', а данный процесс носит название сексдукции.

Некоторые мелкие плазмиды, называемые мобилизуемыми, могут быть перенесены при конъюгации с помощью аппарата переноса «хелперной» трансмиссивной плазмиды. Для этого они должны содержать последовательности, аналогичные *ori* конъюгативной плазмиды и распознаваемые её эндонуклеазами.

Трансдукция–передача генетической информации от донора к реципиенту с помощью умеренных (трансдуцирующих) бактериофагов. К трансдукции способны как умеренные фаги, так и вирулентные, последние, однако, уничтожают популяцию бактерий, поэтому трансдукция с их помощью не имеет большого значения

ни в природе, ни при проведении исследований. Трансдуцирующие фаги могут переносить 1 или более генов (признаков).

Описано 3 вида трансдукии.

1. Общая (неспецифическая) трансдукция

После репродукции фага возможна ошибочная упаковка фрагмента ДНК бактерии донора в капсид фага, ДНК самого фага в нём в этом случае нет. Длина этого фрагмента равна длине нормальной фаговой ДНК. Такой дефектный фаг не способен к репродукции, но может взаимодействовать с клеткой реципиентом. Попадая в эту бактериальную клетку, фрагмент ДНК может включаться в её геном, обычно путём гомологичной рекомбинации.

2. Абортивная трансдукция. В ряде случаев фрагмент ДНК не встраивается в хромосому реципиента, не реплицируется, но сохраняется в клетке, приобретает кольцевую форму и транскрибируется. Передача его при делении клетки происходит по одной клеточной линии. Постепенно он утрачивается в потомстве.

3. Специфическая трансдукция

Осуществляется только умеренными фагами. Наиболее хорошо изучена специфическая трансдукция на примере фага λ . Этот фаг встраивается только в один участок (сайт) хромосомы *E. coli* с определённой последовательностью нуклеотидов. Во время индукции его включение может пройти с ошибкой: вырезается фрагмент тех же размеров что и ДНК фага, но с началом не в том месте. При этом часть генов фага теряется, а часть генов *E. coli* захватывается им. Для каждого специфически встраивающегося в хромосому умеренного фага характерен свой сайт и, соответственно, расположенные рядом с ним гены, которые он способен передавать. Ряд фагов может встраиваться в любое место на хромосоме и переносить любые гены по механизму специфической трансдукции.

Когда умеренный фаг, несущий бактериальные гены, встраивается в хромосому новой бактерии-хозяина, она содержит уже два одинаковых гена – собственный и принесённый извне. Поскольку фаг лишён части собственных генов, часто он не может индуцироваться и размножиться, т.е. является дефектным. Однако при заражении этой же клетки «вспомогательным» фагом того же вида, индуцирование дефектного фага становится возможным. Из хромосомы выходят и реплицируются как ДНК нормального «вспомогательного» фага, так и ДНК дефектного, вместе с переносимыми

им бактериальными генами. Поэтому около 50% образующихся фаговых частиц несут бактериальную ДНК. Это явление носит название трансдукции с высокой частотой (HFT от англ. *high frequency transduction*).

3. Особенности генетики вирусов.

Наследственный материал вирусов представлен либо ДНК, либо РНК. Причем эти молекулы могут быть одноцепочечными или двуцепочечными, кольцевым или линейными. РНК может быть фрагментирована. Передача наследственной информации вирусов происходит в ходе репродукции за счет многократной репликации в клетке – хозяине.

Изменчивость вирусов осуществляется разными механизмами, в зависимости от того, заражена клетка-хозяин одним вирусом или несколькими. При инфицировании клетки двумя и большим количеством вирусов происходит их интерференция, когда репродуцируется только один из вирусов. Различают гомологичную (при инфицировании клетки родственными вирусами) и гетерологичную (если интерферируют неродственные виды) интерференцию. Это явление возникает не при всякой комбинации возбудителей, иногда два разных вируса могут репродуцироваться одновременно (например, вирусы кори и полиомиелита). Интерференция реализуется либо за счёт индукции одним вирусом клеточных ингибиторов (например, ИФН), подавляющих репродукцию другого, либо за счёт повреждения рецепторного аппарата или метаболизма клетки первым вирусом, что исключает возможность репродукции второго.

Существуют также дефектные вирусы, которые существуют как самостоятельные виды, но функционально неполноценны, так как для их репликации необходим «вирус-помощник» (например, для репликации аденоассоциированного вируса необходимо присутствие аденовирусов).

При заражении клетки одним вирусом могут происходить модификации, связанные с изменением химического состава капсида и суперкапсида, а также мутации, при нарушении репликации нуклеиновой кислоты вируса (изменение антигенной структуры, температурная чувствительность, изменение характера повреждений при культивировании).

Если клетка заражена 2 и более разными или одинаковыми вирусами может происходить генетическая рекомбинация при обмене генами между вирусными нуклеиновыми кислотами, генетическая реактивация при сборке 1 полноценного вируса из разных вирусов с инактивированными разными генами и комплементация, когда белки одного вируса-помощника способствуют репродукции другого (дефектного) вируса. Также возможно фенотипическое смешивание (транскарсидизация), когда часть потомства разных вирусов обменивается капсидами или капсидными белками.

Вспомогательные материалы для записи в рабочую тетрадь.

Таблица 22. **Внехромосомные факторы наследственности прокариот**

Факторы	Характеристика	Влияние на наследственность
плазмиды	Малые кольцевые молекулы с 1 или несколькими генами, могут быть в свободном от генома состоянии или в интегрированном	Придают некоторые новые свойства микроорганизму
транспозоны	Малые нуклеотидные последовательности, содержащие генетическую информацию, обеспечивающую транспозицию (перемещение по наследственному материалу) и дополнительный ген	Включаясь в геном, могут приводить к мутациям, за счет дополнительного гена придают дополнительное свойство (обычно устойчивость к антибиотикам)
IS –фрагменты (вставочные последовательности)	Самые малые нуклеотидные последовательности, содержащие только генетическую информацию, обеспечивающую транспозицию	Встраиваясь в ДНК, включают и выключают работу генов, индуцируют мутации

Таблица 23. **Классификация плазмид**

Категории	Свойства, придаваемые бактерии
F-плазмиды	Донорные функции, формирование Sex-пилей
R-плазмиды	Устойчивость к лекарственным препаратам
Col-плазмиды	Синтез бактерицидных веществ (колицинов)
Ent-плазмиды	Синтез токсинов (энтеротоксинов)
Hly-плазмиды	Синтез токсинов (гемолизина)
Плазмиды биодegradации	Разрушение различных органических и неорганических соединений

Таблица 24. Классификация мутаций у бактерий

Признак	Вид мутаций
По происхождению	Спонтанные (ошибки репликации, инсерционные (вставочные)). Индукцированные (под действием мутагенов, встраивание внехромосомных элементов).
По числу мутировавших генов или характеру изменений в первичной структуре ДНК	Генные – точковые (выпадение, вставки, замены пар оснований ДНК). Хромосомные – делеции (утрата участка ДНК), инверсии (поворот фрагмента ДНК на 180о), дупликации (удвоение участка ДНК) и др.
По фенотипическим последствиям	Прямые (потеря или изменение признака). Обратные (восстановление признака): истинные (восстановление генотипа), супрессии (восстановление фенотипа).
По фенотипическим проявлениям	Морфологические (утрата капсулы, клеточной стенки, жгутиков) Биохимические (ауксотрофность, резистентность к ядам и др.) Культуральные (S – R диссоциация – переход гладких колоний в шероховатые)
По влиянию на жизнедеятельность	Летальные (гибель) Условно-летальные (гибель при определенных условиях, например у температурочувствительных мутантов) Нейтральные (не влияют на жизнедеятельность)

Таблица 25. Виды изменчивости вирусов

Кол-во вирусов в клетке	Вид изменчивости	События
1	Модификации	Изменение хим. состава капсида и суперкапсида
	Мутации	Нарушение репликации НК вируса (изменение антигенной структуры, температурная чувствительность, изменение характера повреждений при культивировании)
2 и более разных или одинаковых вирусов	Генетическая рекомбинация	Обмен генами между вирусными нуклеиновыми кислотами.
	Генетическая реактивация	Сборка 1 полноценного вируса из разных вирусов с инаktivированными разными генами
	Комплементация	Белки одного вируса способствуют репродукции другого (дефектного) вируса
	Фенотипическое смешивание (транскарпидация)	Часть потомства разных вирусов обменивается капсидами или капсидными белками

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Генетика микроорганизмов

1. Могут иметь только один ген, отвечающий за дополнительный признак у бактерий:

- а) нуклеоиды в) плазмиды
- б) транспозоны г) IS – фрагменты

2. F- плазмиды участвуют в процессе:

- а) конъюгации в) трансформации
- б) трансдукции г) не участвуют в генетических процессах

3. К генным мутациям относятся:

- а) делеции в) дупликации
- б) инверсии г) точковые

4. Поступление в клетку реципиента изолированной ДНК происходит при:

- а) трансформации в) неспецифической трансдукции
- б) конъюгации г) специфической трансдукции

5. Обмен генами между вирусными нуклеиновыми кислотами – это:

- а) мутация в) комплементация
- б) рекомбинация г) транскрипсидизация

6. Сайт – специфическая трансдукция осуществляется:

- а) вирулентными фагами в) умеренными фагами
- б) F – плазмидами г) F⁺ – плазмидами

7. Сборка полноценного вируса из частей разных неполноценных вирусов в одной клетке:

- а) рекомбинация в) транскрипсидизация
- б) реактивация г) комплементация

8. Устойчивость бактерий к лекарственным препаратам обеспечивают:

- а) F – плазмиды в) Col – плазмиды
- б) R – плазмиды г) Ent – плазмиды

9. Рекомбинация, связанная с контактом 2-ух клеток:

- а) трансформация в) конъюгация
- б) специфическая г) неспецифическая
- трансдукция трансдукция

10. Ауксотрофность относится к классификации мутаций:
- а) по происхождению в) по фенотипическим последствиям
 - б) по фенотипическим г) по влиянию на жизнедеятельность проявлением
11. Обмен капсидами у разных вирусов в зараженной клетке:
- а) фенотипическое смешивание в) комплементация
 - б) генетическая реактивация г) генетическая рекомбинация
12. К хромосомным мутациям не относятся:
- а) делеции в) дупликации
 - б) инверсии г) точковые
13. При встраивании F – плазмиды в «хромосому» клетки донора образуется:
- а) F⁺ клетки в) F – клетки
 - б) Hfr – клетки г) F' – клетки
14. Не имеют генов, отвечающих за признаки бактерий:
- а) транспозоны в) нуклеотиды
 - б) плазмиды г) IS – фрагменты
15. Интеграция привнесенного фрагмента ДНК в строго определенный участок генома клетки происходит при:
- а) специфической трансдукции в) трансформации
 - б) неспецифической г) abortивной трансдукции
- трансдукции
16. S – R диссоциация относится к мутациям:
- а) морфологическим в) культуральным
 - б) биохимическим г) летальным
17. Не происходит интеграция привнесенного фрагмента ДНК в геном клетки при:
- а) неспецифической в) сайт – специфической трансдукции
 - б) abortивной г) трансформации
- трансдукции
18. Образование sex – пилей обеспечивают:
- а) F – плазмиды в) Col – плазмиды
 - б) R – плазмиды г) Ent – плазмиды

19. Способствование одним вирусам репродукции другого дефектного вируса:

- | | |
|-----------------|----------------------|
| а) реактивация | в) комплементация |
| б) рекомбинация | г) транскapsидизация |

20. Превращение F^- клеток в F^+ происходит в процессе:

- | | |
|--------------------------------|------------------|
| а) специфической трансдукции | в) трансформации |
| б) неспецифической трансдукции | г) конъюгации |

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 5

Методы изучения рекомбинации у бактерий

Цель лабораторного занятия:

1. Изучить способы постановки опытов трансформации, трансдукции и конъюгации бактерий.
2. Научиться рассчитывать частоту генетических рекомбинаций.

Описательная часть лабораторного занятия.

Изучение явления генетической рекомбинации у бактерий возможно путем постановки определенных опытов. Отбор рекомбинантов осуществляется на селективных средах.

Опыт трансформации.

Реципиент – штамм *Bacillus subtilis* (сенная палочка, чувствительная к стрептомицину – Str^S). Донор – ДНК, выделенная из штамма *B. subtilis* Str^R (устойчивого к стрептомицину). Селективная среда для отбора рекомбинантов (трансформантов) – питательный агар, содержащий 100 ЕД/мл стрептомицина. Вырашивают бульонную культуру *B. subtilis* Str^S и берут 1 мл культуры с определенным количеством бактерий. Готовят десятикратное разведение культуры в пробирках с 0,9 мл изотонического раствора NaCl до 10^{-6} степени, перенося последовательно в каждую пробирку 1 мл суспензии из предыдущей пробирки. Из последнего разведения (10^{-6}) делают посев 0.1 мл суспензии культуры на чашках Петри со средой МПА, причем в одной чашке в эту среду добавляют стрептомицин, а в другой – нет. Берут также пробирку с 1 мл исходной бульонной культуры и добавляют 1 мкг/л (10^{-3} мкг/мл)

ДНК, выделенной из штамма донора *B.subtilis* Str^R. Инкубируют 30 минут при 37 °С. Затем в эту же пробирку вносят 0,1 мг/мл раствора фермента ДНК – азы в 0,5 мл хлорида магния для разрушения ДНК, не проникшей в бактериальные клетки реципиентного штамма, а оставшуюся в среде, и выдерживают 5 минут. Из этой же пробирки делают посев 0,1 мл смеси на чашку Петри со средой МПА, содержащей стрептомицин. Все посеы инкубируют одни сутки в термостате при 37 °С. После этого, учитывают результаты опыта, посчитав выросшие колонии *B.subtilis*. На среде со стрептомицином исходный реципиентный штамм не дает роста. На такой среде вырастают только рекомбинантные клетки, получившие через донорную ДНК признак устойчивости к стрептомицину. На среде без стрептомицина реципиентный штамм дает нормальный рост, а так как посев был сделан из большого разведения, то на чашке вырастает сосчитываемое количество колоний. Исходя из этого, можно сосчитать какое количество клеток содержалось в 1 мл исходной суспензии штамма реципиента.

Опыт специфической трансдукции.

Реципиент – штамм *Escherichia coli lac*⁻, лишенный бетта-галактозидазного оперона, контролирующего ферментацию лактозы. Трансдуцирующий фаг лямбда dgal, в геноме которого часть генов замещена бетта-галактозидазным опероном *Escherichia coli*. Этот фаг является дефектным, т.е. неспособным вызвать продуктивную инфекцию, заканчивающуюся лизисом кишечной палочки, и обозначается буквой d с названием содержащегося в его геноме бактериального оперона gal (кодирующего бетта – галактозидазу).

Селективная среда – среда Эндо, на которой лактозоотрицательные бактерии реципиентного штамма образуют бесцветные колонии, а лактозоположительные колонии рекомбинантного штамма приобретают красный цвет с металлическим оттенком. Это связано с тем, что лактозоположительные бактерии ферментируют лактозу, находящуюся в среде, с образованием кислых продуктов реакции, которые восстанавливают цвет обесцвеченного красителя фуксина входящего в состав среды.

Выращивают 3 часовую бульонную культуру штамма *Escherichia coli lac*⁻. К 1 мл культуры добавляют 1 мл трансдуцирующего фага лямбда dgal в концентрации 10^6 – 10^7 частиц в 1 мл. Инкубируют смесь при 37° в течение 60 минут, после чего приго-

товляют ряд десятикратных разведений до 10^{-5} – 10^{-6} (в зависимости от предполагаемой концентрации бактерий во взвеси) для получения на среде сосчитываемого количества колоний. Из последней пробирки наносят по 0,1 мл суспензии на 3 чашки Петри со средой Эндо и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды. Инкубируют посевы при 37° одни сутки. Затем учитывают результаты опыта, посчитав количество бесцветных колоний (растущих без расщепления лактозы) и красных колоний рекомбинантов, получивших признак расщепления лактозы.

В опыте обязательно предусматривается контроль лактозотрицательной культуры. Для этого 0,1 мл исходной суспензии реципиентного штамма высевают отдельно на чашки Петри со средой Эндо и инкубируют при указанном режиме. На этой чашке все колонии должны быть бесцветными.

Опыт конъюгативной рекомбинации.

Донор – штамм *Escherichia coli* K12 Hfr leu⁺ Str^S (штамм с высокой частотой рекомбинации, способный синтезировать аминокислоту лейцин и чувствительный к стрептомицину). Реципиент – штамм *Escherichia coli* K12 F⁻, leu⁻ Str^R (штамм способный принимать генетический материал через конъюгативный мостик, не синтезирующий лейцин и устойчивый к стрептомицину). Селективная среда для выделения рекомбинантов – минимальная глюкозо-солевая среда без факторов роста со стрептомицином, на которой могут расти только прототрофы, устойчивые к данному антибиотику: KH_2PO_4 – 6,5г; MgSO_4 – 0,1 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,001 г; FeSO_4 – 0,0005 г; глюкоза – 2 г; стрептомицин – 200 ЕД/мл; дистиллированная вода – 1л.

Выращивают трехчасовые бульонные культуры реципиента (штамм *Escherichia coli* K12 F⁻, leu⁻ Str^R) и донора (штамм *Escherichia coli* K12 Hfr leu⁺ Str^S). Делают десятикратное разведение из 1 мл культуры реципиента до 10^{-6} после чего наносят 0,1 мл из последнего разведения на 2 контрольные чашки: 1) на минимальную среду, без лейцина со стрептомицином (контроль отсутствия способности синтезировать лейцин); 2) на полную среду с лейцином и стрептомицином (контроль устойчивости культуры к стрептомицину и определение количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии). Из суспензии культуры донора берут по 0,1 мл и делают посев также на 2 контрольные чашки: 1) на минимальную

среду без лейцина со стрептомицином (контроль чувствительности культуры донора к стрептомицину); 2) на минимальную среду без лейцина и стрептомицина (контроль способности донора синтезировать лейцин). Берут 1 мл взвеси культуры реципиента и 1 мл взвеси культуры донора смешивают и инкубируют смесь 30 минут при 37 °С. Затем смесь разводят до 10^{-2} – 10^{-3} и высевают 0,1 мл на селективную минимальную среду со стрептомицином в чашки Петри.

Инкубируют все посевы 1 сутки при 37°, затем учитывают результаты на контрольных чашках с реципиентом: 1) на среде со стрептомицином без лейцина нет роста; 2) на полной среде со стрептомицином растет сосчитываемое количество колоний реципиентного штамма, дающее возможность рассчитать количество жизнеспособных клеток в исходной суспензии;

На контрольных чашках с донором: 1) на минимальной среде со стрептомицином роста нет; 2) на минимальной среде без стрептомицина есть рост газонем;

На опытной чашке с минимальной средой со стрептомицином вырастают только колонии рекомбинантов, получивших признак способности синтезировать лейцин от донора и имеющие собственную устойчивость к стрептомицину.

Оснащение лабораторного занятия.

Бульонная культура штамма *Bacillus subtilis*, чувствительного к стрептомицину. Флаконы с ДНК, выделенной из штамма *Bacillus subtilis*, устойчивого к стрептомицину.

Флаконы с раствором ДНК-азы в хлориде магния. Чашки Петри с МПА, содержащим 100 ЕД/мл стрептомицина. Чашки Петри с МПА без стрептомицина, стерильные пипетки, шпатели Дригальского, спиртовки, спички, стеклоглафы, стаканчики со спиртом.

Таблицы: «Конъюгация, трансформация и трансдукция у бактерий», схемы опытов трансформации, специфической трансдукции и конъюгации.

Ход выполняемой работы.

1. Разобрать по таблице схему опыта специфической трансдукции.

2. Учесть результаты опыта трансформации по отношению количества рекомбинантных колоний к количеству реципиентных.

Исходное количество реципиентных клеток определяют, учитывая степень разведения суспензии, взятой для посева.

3. Определить частоту специфической трансдукции в данном опыте по отношению среднего количество рекомбинантных колоний к общему среднему количеству выросших колоний на чашку Петри.

4. Учесть результаты опыта специфической трансдукции по отношению количества рекомбинантных колоний к количеству реципиентных. Исходное количество реципиентных клеток определяют, учитывая степень разведения суспензии, взятой для посева.

5. Разобрать по таблице схему опыта конъюгативной рекомбинации.

6. Определить частоту конъюгативной рекомбинации в данном опыте по отношению количества рекомбинантных колоний к количеству реципиентных. Исходное количество реципиентных клеток определяют, учитывая степень разведения суспензии, взятой для посева.

7. Записать в альбоме схемы постановки опытов и результаты определения частоты генетической рекомбинации у бактерий.

Программа лабораторного занятия.

Домашнее задание:

а) Заполнить рабочую тетрадь по теме:

1. Таблица 22. Внехромосомные факторы наследственности прокариот.

2. Таблица 23. Классификация плазмид.

3. Таблица 24. Классификация мутаций у бактерий.

4. Таблица 25. Виды изменчивости вирусов.

б) Выучить:

1. Наследственность у прокариот.

2. Виды изменчивости у прокариот.

3. Виды мутаций у прокариот.

4. Виды рекомбинаций у прокариот (трансформация, трансдукция, конъюгация).

5. Особенности генетики вирусов.

Рабочее задание:

1. Проанализировать опыт трансформации у бактерий.

2. Рассчитать частоту трансформации в опыте.

3. Проанализировать опыт трансдукции у бактерий.

4. Рассчитать частоту трансдукции в опыте.
5. Проанализировать опыт конъюгации у бактерий.
6. Рассчитать частоту конъюгации в опыте.

Содержание альбома:

1. Рис. 1. Схема опыта трансформации.
2. Рис. 2. Схема опыта трансдукции.
3. Рис. 3. Схема опыта конъюгации.

Пример заполнения альбома

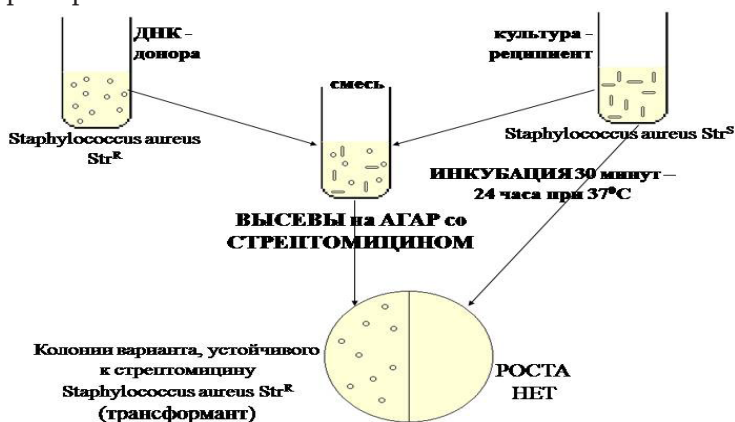


Рис. 1. Схема опыта трансформации



Рис. 2. Схема опыта трансдукции



Рис. 3. Схема опыта конъюгации

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бушева Е.Б. Методическое руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – Тирасполь, 2007.
2. Бушева Е.Б. Микробиология в таблицах, схемах и рисунках: учебное пособие. – Тирасполь, 2010.
3. Гусев М.В. Микробиология [Текст]: учебник для студ. уч-режд. высш. проф. образования / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2010. – 464с.
4. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии [Текст]: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – М., 2004. – 256 с.
5. Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тюменцева Е.Ю.– Электрон. текстовые данные. – Омск: Омский государственный институт сервиса, 2015. – 123 с.– Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788>
6. Шапиро Я. С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы [Текст]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро. – М, 2003. – 323 с.
7. ibooks.ru [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://ibooks.ru>
8. Znaniyum.com [Электронный ресурс]: электронно-библиотечная система. – URL: <http://znaniyum.com>

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Раздел. ФИЗИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ	5
ТЕМА 1. РАЗМНОЖЕНИЕ И РОСТ ПРОКАРИОТ	5
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	5
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	16
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	18
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	24
Тема 2. ПИТАНИЕ ПРОКАРИОТ	24
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	24
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	30
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	32
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	37
Тема 3. МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ	38
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	38
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	44
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	46
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	51
Тема 4. ФИЗИОЛОГИЯ ВИРУСОВ	52
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	52
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	59
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	61
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	67
Тема 5. ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ	68
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	68
ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ	78
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	80
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	86