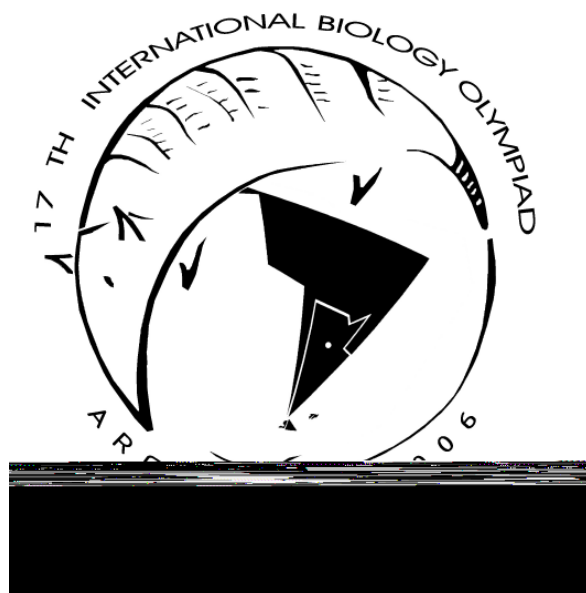


17-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА
9 - 16 июля 2006
Río Cuarto – Республика Аргентина



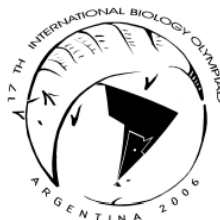
ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ

4

МИКРОБИОЛОГИЯ

Код участника:	
----------------	--

17-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА
9 - 16 июля 2006
Río Cuarto – Республика Аргентина



Общие замечания к практическому тесту

ДОРОГИЕ УЧАСТНИКИ

Практический тест проводится в различных лабораториях.

№ 1- Анатомия, систематика и физиология растений

№ 2- Анатомия, экология и систематика животных

№ 3- Биохимия

№ 4- Микробиология

- Вам предоставляется по **1 часу** на лабораторные работы №1 и №2
- Вам предоставляется по **1 часу 30 минут** на лабораторные работы №3 и №4.
- Максимальное количество баллов за каждую лабораторную работу составляет **40 баллов**, то есть 160 баллов за весь практический тест.

Желаем успеха !!!!!!!

Практический тест

МИКРОБИОЛОГИЯ

Существуют различные системы классификации бактерий, но наиболее часто используется система, опубликованная в «Руководстве по определению бактерий Берги».

Ниже представлена рабочая схема идентификации штамма бактерий, исходя из биохимической точки зрения:

- 1) Изолирование штамма и получение его чистой культуры.
- 2) Микроскопирование живых клеток и окрашенных по Граму мазков. Таким образом, определяется морфология изучаемого микроорганизма и его окраска по Граму. Также важно определить способность образовывать группы клеток, наличие спор, а также другие признаки важные для идентификации.
- 3) Определение особенностей питания (как правило, они следуют из методов, использованных ранее при выделении бактерий и их культивировании): фотоавтотрофы, фотогетеротрофы, хемоавтотрофы, хемогетеротрофы.
- 4) Проведение первичных тестов. Следующая группа тестов, называемых первичными тестами, используется для определения рода, группы родов, и, в некоторых случаях, семейства, к которому принадлежит изолированный организм. К первичным тестам относятся, помимо окраски по Граму и морфологических наблюдений, определение каталазы, оксидазы, сбраживание глюкозы, а также установление подвижности.

Реактивы и оборудование

1. Капельница с раствором генцианового фиолетового (готов к использованию)
2. Капельница с раствором Люголя (готов к использованию)
3. Капельница с раствором для обесцвечивания (готов к использованию)
4. Капельница с раствором сафранина (готов к использованию)
5. Капельница с дистиллированной водой
6. 1 штатив для пробирок

7. 2 пробирки, содержащие культуры организмов А и В, выращенных на среде Лурия-Бертани.
8. 2 пары лабораторных перчаток
9. Респираторная маска
10. Маркерный карандаш
11. Бумажная салфетка
12. 1 горелка Бунзена
13. Микроскоп
14. Бактериологическая петля
15. 4 предметных стекла
16. Подставка с держателем для стекол
17. 1 пластиковая бутылка с водой для промывания
18. 1 одноразовый стакан
19. 1 капельница с иммерсионным маслом
20. 1 капельница с 3% раствором H_2O_2
21. 2 чашки с агаризованной средой Лурия-Бертани (LB средой), инокулированной организмами А и В.
22. 1 Эппендорф-пробирка с 2 оксидазными дисками
23. 1 пинцет
24. 2 пробирки
25. 1 пробирка с пробкой, содержащая стерильную дистиллированную воду.
26. 1 пластиковая пипетка Пастера.
27. 3 чашки с агаризованной средой ЕМВ, содержащей эозин и метиленовый синий (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
28. 3 пробирки со скошенным фенилаланиновым агаром (Ph agar) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная).
29. 1 капельница, содержащая 10% раствор хлористого железа
30. 3 пробирки со средой SIM (для определения сероводорода, индола и подвижности бактерий) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
31. 1 капельница с индоловым реагентом

32. 3 пробирки, содержащие бульон с мочевиной (среда UREA) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
33. 3 пробирки со средой MIO (содержащей индол и орнитин и служащей для определения подвижности) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
34. Три пробирки с цитратным агаром Симмонса (среда SC) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная).
35. Часы, находящиеся в поле зрения всех студентов в лаборатории.

Предостережение:

Будьте внимательны в обращении со средами и реактивами, так как предоставленные их количества позволяют провести этот практический тест только один раз.

При небрежной работе и резких движениях, вы можете инфицировать среду и не получить хороших результатов.

Вы проведете биохимические тесты, основа и интерпретация которых описаны в деталях ниже, с использованием питательных сред, реактивов, а также предоставленной бактериологической информации (схемы и диаграммы)

Примечание: Не выбрасывайте пробирки с организмами А и В. Вы будете использовать их также в задании 2.

ЗАДАНИЕ 1: Окрашивание организмов А и В по Граму.

ХОД РАБОТЫ

Введение:

Окраска по Граму различает два главные типа бактериальных клеточных стенок. Некоторые виды бактерий, благодаря химической природе своих клеточных стенок,

способны задерживать краситель генциановый фиолетовый даже после обработки клеток обесцвечивающим веществом, представляющим собой смесь ацетона и спирта.

Техника окраски по Граму

1. Приготовьте мазки организмов А и В и дайте им высохнуть на воздухе.
2. Зафиксируйте материал на стекле, чтобы он не был смыт при процедуре окрашивания, проводя его три или четыре раза через пламя горелки Бунзена.
3. Поместите мазки на подставку для окраски и покройте поверхность раствором генцианового фиолетового.
4. После 30 секунд выдержки в растворе генцианового фиолетового тщательно промойте препараты проточной водой.
5. Затем покройте мазки раствором Люголя на 30 секунд.
6. Держа каждый препарат большим и указательным пальцем, покройте поверхность несколькими каплями спиртового раствора ацетона для обесцвечивания до исчезновения фиолетового цвета. Обычно для этого требуется до 10 секунд.
7. Промойте препарат проточной водой и опять поместите его на подставку для окраски. Залейте поверхность раствором сафранина для контрастного окрашивания на 20 секунд. Промойте препарат проточной водой.
8. Поместите мазки в вертикальном положении на подставку для окрашивания, для стока избытка воды.
9. Рассмотрите окрашенный мазок при увеличении 100х под маслом с иммерсионным объективом микроскопа.
10. Когда вы сфокусируете микроскоп, позовите ассистента.

Результаты

ВЫБЕРИТЕ ПРАВИЛЬНЫЙ ОТВЕТ, ВНЕСЯ ЕГО В СООТВЕТСТВУЮЩУЮ КЛЕТКУ

Организм	Окраска по Граму		Проверка ассистентом
	положительная	отрицательная	
А	положительная	отрицательная	
В	положительная	отрицательная	

Вопрос

Вариабельность по Граму

~~А) — Это термин, который может быть применен, если наблюдаются две реакции по Граму из-за ошибки при окраске образца.~~

~~В) — Применяется к организму, который меняет структуру своей клеточной стенки от грам-положительного типа до грамотрицательного типа с возрастом культуры.~~

~~С) — Применяется в том случае, когда клетки в культуре грамположительной бактерии теряют способность удерживать первичный краситель во время процесса обесцвечивания.~~

~~Д) — Применяется только для нечистых культур.~~

~~Впишите букву, соответствующую правильному ответу на пунктирную линию ниже:~~

ЗАДАНИЕ 2: Биохимическая характеристика организмов А и В.

В этой части практической работы вы будете определять при помощи биохимических тестов (уже предоставленных вам или проведенных вами) семейство и род двух организмов, обозначенных А и В.

Реакция на каталазу:

Некоторые бактерии содержат флавопротеины, восстанавливающие кислород с образованием перекиси водорода (H₂O₂) или супероксида (O₂⁻), которые чрезвычайно токсичны, поскольку являются мощными окислителями, способными разрушить клеточные компоненты в короткое время. Многие бактерии содержат ферменты, защищающие клетки от этих токсических соединений.

Методика

Проведите тест на каталазу у организмов А и В путем добавления 2 капель H₂O₂ к бактериальной суспензии, помещенной на предметное стекло (по 3 петли жидкой культуры, подписанной LB-A и LB-B).

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Какая реакция осуществляется ферментом каталазой?

- 1) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
- 2) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- 3) $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- 4) $4 \text{O}_2^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 3 \text{O}_2$

Впишите номер, соответствующий правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....

Оксидазная реакция:

Тест используется для обнаружения фермента цитохром-с-оксидазы, который присутствует у различных родов, например *Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp.

Оксидазные диски содержат диметил-пара-фенилендиамин, который является субстратом фермента цитохром-с-оксидазы.

Организмы, обладающие этим ферментом, в присутствии атмосферного кислорода и субстрата, содержащегося на оксидазных дисках, приводят к образованию пурпурно-фиолетовой окраски.

Методика

Проведите оксидазный тест на организмах А и В в соответствии с последующими инструкциями.

Оксидазный тест проводится с использованием пробирок. Приготовьте из чистой культуры густую суспензию в 0,2 мл стерильной дистиллированной воды и добавьте один оксидазный диск.

Примечание: приготовьте бактериальные суспензии из биомассы 3-х колоний, взятых с чашек, соответственно помеченных LB-A и LB-B.

Результаты

Как правило, положительный результат наблюдается при комнатной температуре в течение первой минуты. Запоздавшая реакция, проявляющаяся после 2 минут, должна рассматриваться как **отрицательный** результат.

Положительная реакция: диски окрашиваются в пурпурно-фиолетовый цвет.

Отрицательная реакция: нет изменений в цвете дисков.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

АГАР (EMB), СОДЕРЖАЩИЙ ЭОЗИН И МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ

Эта среда используется для селекции быстрорастущих и не обладающих специфическими питательными потребностями грамотрицательных бактерий.

На среде EMB растут все представители Enterobacteriaceae.

Цель

Эта среда объединяет две среды Холта-Харриса и Левайна и позволяет выделять представителей Enterobacteriaceae и другие грамотрицательные бактерии. Установление различий между организмами, сбраживающими лактозу и/или сахарозу, и между организмами, не сбраживающими их, возможно благодаря присутствию индикаторов эозина и метиленового синего. Кроме того, эти индикаторы ингибируют рост некоторых грамположительных бактерий.

Колонии многих штаммов *Escherichia coli* и *Citrobacter spp.* приобретают на этой среде зеленоватый металлический блеск.

Организмы, сбраживающие лактозу и/или сахарозу, образуют колонии с темным центром, окруженным голубым или розовым цветом, в то время как организмы, не сбраживающие лактозу и/или сахарозу, образуют бесцветные колонии.

На этой среде растут не только представители Enterobacteriaceae, но и другие организмы.

Инструкции

Используя предоставленные чашки со средой EMB (обозначенные как EMB-A и EMB-B соответственно для организмов А и В), определите потребление сахарозы и/или лактозы организмами А и В.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Брожение

- А)** приводит к образованию кислоты и возможно газа вследствие распада сахаров.
- В)** связано с типом роста факультативных анаэробов в тиогликолатной среде (тиогликолат является восстанавливающим агентом), где рост задерживается в анаэробных условиях.
- С)** как правило связано с положительной реакцией на каталазу у организма.

Впишите букву, соответствующую правильному ответу на пунктирную линию ниже:

.....

Фенилаланиновый агар (Пробирки обозначены Ph)

Фенилаланиновый агар рекомендуется для обнаружения фенилпировиноградной кислоты, которая образуется из фенилаланина при дезаминировании. Положительная реакция приводит к образованию зеленой окраски при добавлении 10% раствора хлорида железа.

Инструкции

Добавьте 4 или 5 капель раствора хлорида железа в пробирки со скошенным фенилаланиновым агаром (обозначенным Ph-A и Ph-B соответственно). После добавления реагента поворачивайте пробирку. Интенсивная зеленая окраска, проявляющаяся в течение 10 минут, указывает на присутствие фенилпировиноградной кислоты.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Среда (SIM) (сероводород, индол, подвижность) (Пробирки обозначены SIM A и SIM B)

Эта среда используется для определения сероводорода и индола и обнаружения подвижности бактерий в одной и той же пробирке. Образование сероводорода на этой среде происходит из тиосульфата или цистеина. Любое почернение вдоль линии инокуляции рассматривается как положительная реакция на сероводород, которая обычно появляется между 18 и 24 часами после посева. Подвижные культуры в среде SIM показывают диффузный рост вдали от линии инокуляции. Это подходящая среда

для обнаружения листерий, имеющих характерную подвижность "подобного зонтику". Высокое содержание триптофана в этой среде делает ее пригодной также для обнаружения образования индола.

Инструкции

Используя предоставленные пробирки (обозначенные SIM-A и SIM-B для организмов А и В соответственно), определите образование сероводорода и индола, а также подвижность организмов А и В.

Для обнаружения образования индола добавьте 5 капель реактива (обозначенного как **indole**) к культуре, выращенной на агаризованной среде SIM. Быстро развивающаяся розовая окраска указывает на присутствие индола.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Отрицательный результат при определении подвижности:

- A)** обнаруживается, когда рост появляется только вдоль линии, где произошла инокуляция среды уколком.
- B)** должен быть подтвержден на молодой жидкой культуре того же организма.
- C)** может показывать рост на поверхности среды.
- D)** может встречаться у строго аэробных, подвижных организмов.

Впишите букву/ы, соответствующую/ие правильному/ым ответу/ам, на пунктирную линию ниже:

.....

БУЛЬОН С МОЧЕВИНОЙ

Эта среда применима для дифференцирования организмов, синтезирующих уреазу.

Инструкции

Используя пробирки с бульоном с мочевиной (обозначенные как UREA-A и UREA-B для организмов А и В соответственно), определите образование уреазы организмами А и В.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

ЦИТРАТНЫЙ АГАР СИММОНСА

Эта среда способна выявить различия между организмами, содержащими ферменты цитратпермеазы, и организмами, не содержащими таких ферментов.

Инструкции

Используя предоставленные пробирки с цитратным агаром Симмонса (обозначенные как SC-A и SC-B для организмов А и В соответственно), определите наличие роста для организмов А и В.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (присутствие роста) и – (отсутствие роста).

Среда (MIO) (подвижность, индол, орнитин)

На этой среде наблюдаются следующие реакции:

- Декарбоксилирование орнитина (ODC). Наблюдайте в нижних трех четвертях среды (анаэробная область) за изменением в цвете индикатора pH; для правильного анализа результатов рост должен происходить в этой части пробирки:
 - Серый, голубой или пурпурный цвет: положительная реакция на декарбоксилирование орнитина – образование сильно щелочного продукта, нейтрализующего кислоту, образующуюся при сбраживании глюкозы.

- Желтый цвет: отрицательная реакция. Желтый цвет соответствует "необразованию" кислоты при сбраживании глюкозы

Инструкции

Используя пробирки со средой МЮ (обозначенные как МЮ-А и МЮ-В для организмов А и В соответственно), определите у организмов А и В образование фермента орнитиндекарбоксилазы.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов на странице 14, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Результаты:

Результаты биохимических

род	Окраска по Граму	форма	Каталазная реакция	Сбраживание глюкозы	Сбраживание лактозы	Фенилаланиндеаминаза	Использование цитрата
<i>Bacillus</i>	+	Палочка	+	+ или –	?	?	?
<i>Staphylococcus</i>	+	кокк	+	+	?	?	?
<i>Enterobacter</i>	–	Палочка	+	+	+	–	+
<i>Morganella</i>	–	Палочка	+	+	–	+	–
<i>Pseudomonas</i>	–	Палочка	+	–	–	–	?

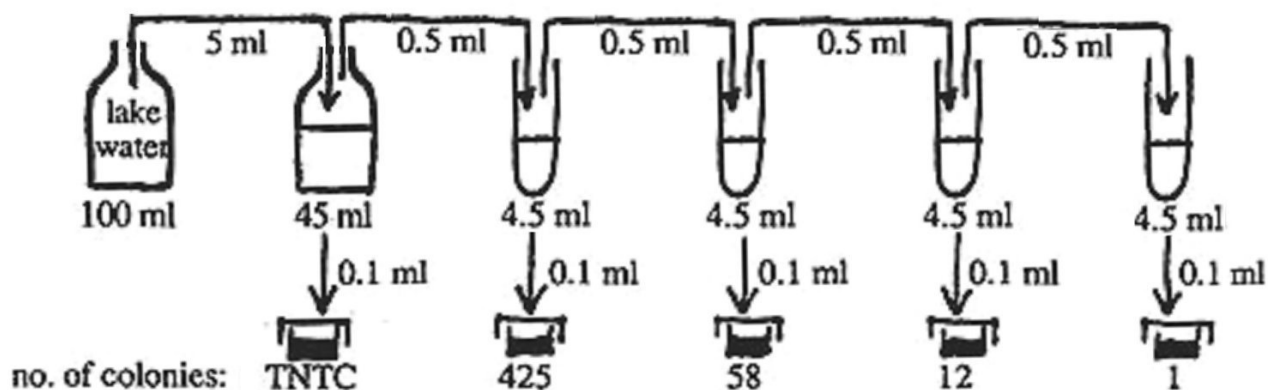
а. Результаты какого специфического лабораторного теста позволят различить *Bacillus* от *Staphylococcus* а также от трех остальных родов?

- A)** Сбраживание глюкозы
- B)** Использование цитрата
- C)** Каталазная реакция
- D)** Окраска по Граму

Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....

2. Рассмотрите следующую схему разведений:



a. Определите общее число колониобразующих единиц (cfu) в 100 мл исходного образца озерной воды. (TNTC=слишком высокая плотность бактерий, чтобы проводить подсчет)

- A) $5,8 \cdot 10^7$ cfu / 100 мл
- B) $4,25 \cdot 10^8$ cfu / 100 мл
- C) $1,2 \cdot 10^9$ cfu / 100 мл

Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....

b. Ожидаете ли Вы получить какие-либо изменения в ответе на предыдущий вопрос, если бы первое разведение было произведено добавлением одного мл образца к 9 мл растворителя?

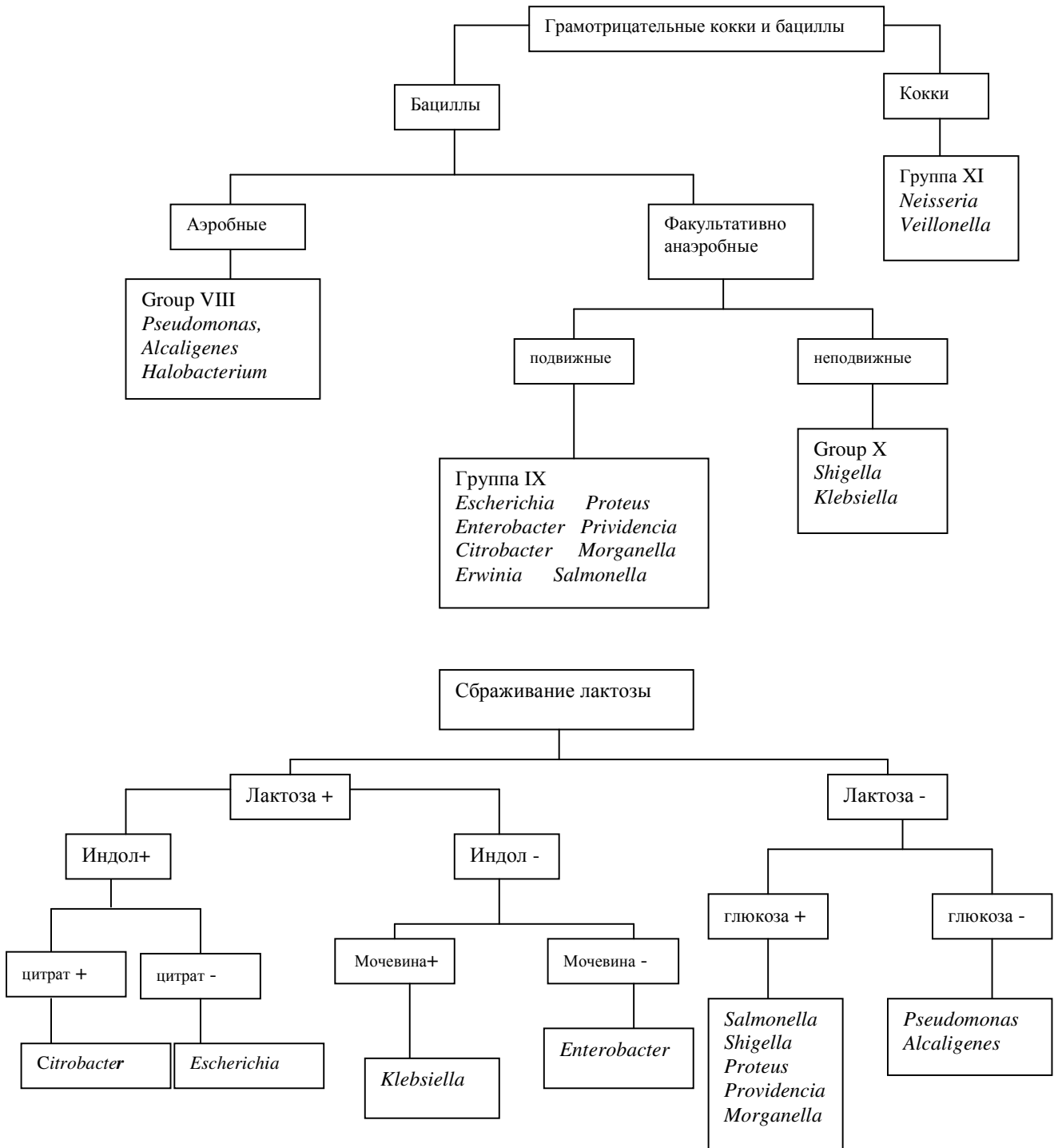
- A) Да
- B) Нет

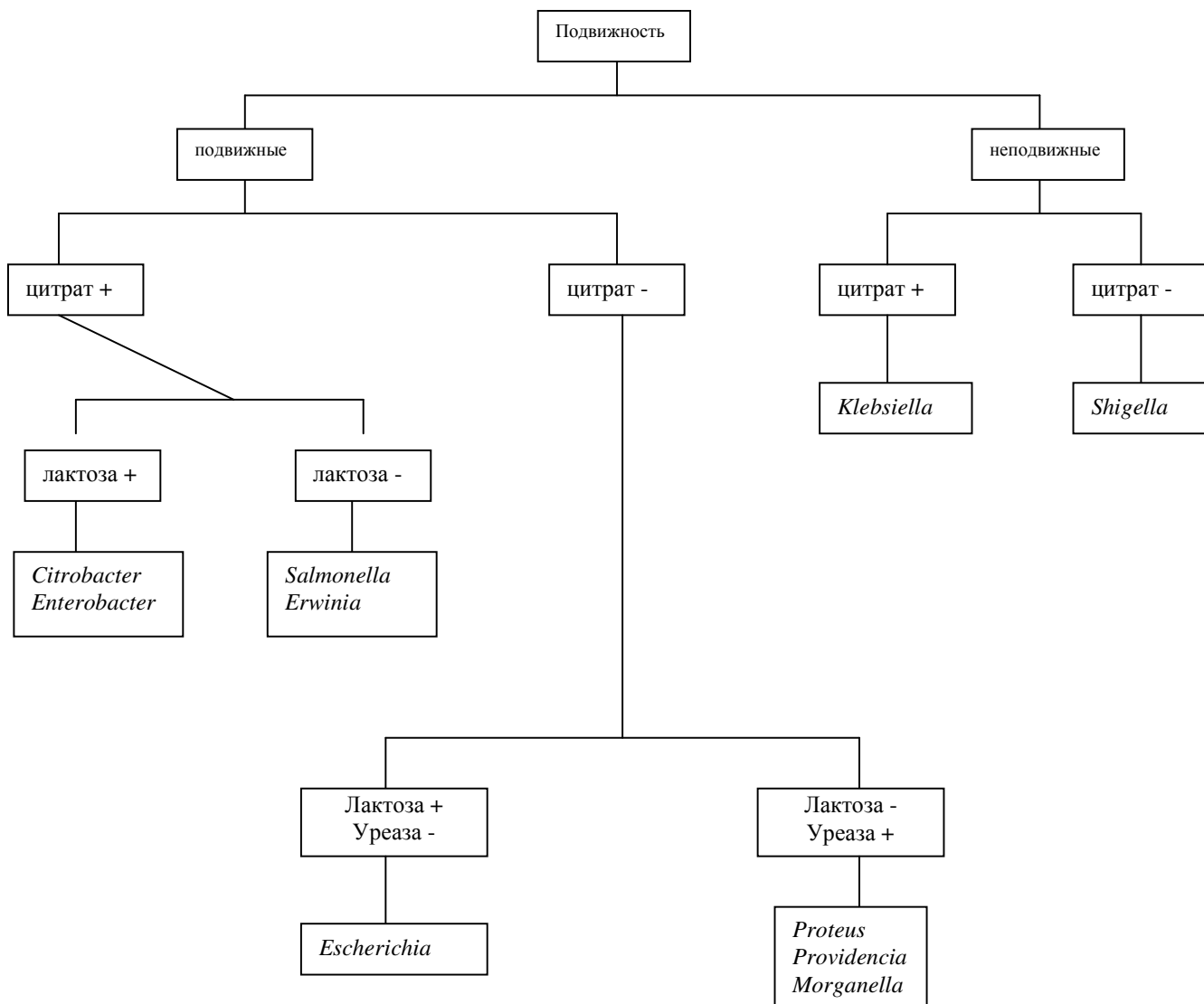
Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....

Дополнение 1

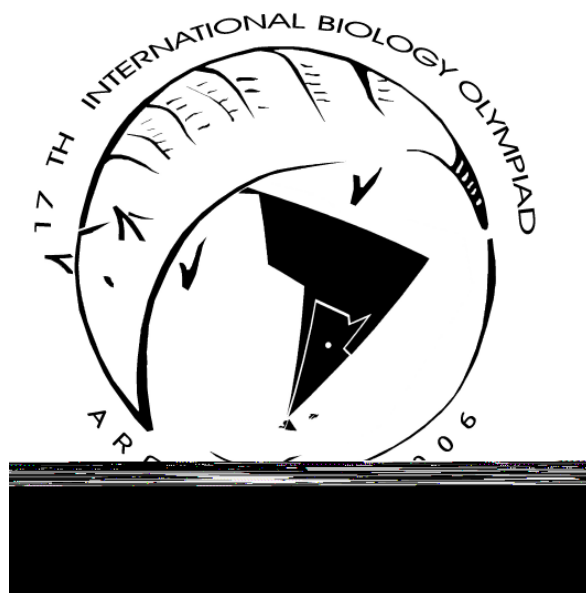
Окраска по Граму (свежая культура)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
форма	кокк	кокк	кокк	кокк	палоч-ка	палочка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	кокк
образование групп	класте-ры	класте-ры	цепоч-ки	тетра-ды									пары
аэробный рост	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
анаэробный рост	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
подвижность	-	-	-	-	-	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+	-
каталаза	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
оксидаза									+	+	-	+	+
Сбраживание глюкозы до кислоты и/или кислоты и газа	-	+	+	+	+	+ (или -)	+	-	-	-	+	+	-
<i>Micrococcus</i>	X												
<i>Staphylococcus</i>		X											
<i>Streptococcus</i>			X										
<i>Lactococcus</i>			X										
<i>Enterococcus</i>			X										
<i>Clostridium</i>						X							
<i>Bacillus</i>							X	X					
<i>Alcaligenes</i>									X				
<i>Pseudomonas</i>										X			
<i>Enterobacterias</i>											X		
<i>Aeromonas</i>												X	
<i>Chromobacterium</i>												X	
<i>Neisseria</i>													X





Семейство	Род	окисление										
		каталаза	лакто- зы	сахарозы	подвижность	индол	SH ₂	фенил- аланин	ODC	уреаза	цитрат	оксидаза
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Shigella</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	<i>Citrobacter</i>	+	+ / -	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+ / -	+	+	+	+	+ / -	-
	<i>Morganella</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Enterobacter</i>	+	+	+ / -	+	-	-	-	+	+ / -	+	-
	<i>Serratia</i>	+	+ / -	+ / -	+	-	-	-	+ / -	+	+	-
	<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+ / -	-
Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	+	?	-	+	-	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+

17-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА
9 - 16 июля 2006
Río Cuarto – Республика Аргентина



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ

4

МИКРОБИОЛОГИЯ

Код участника:	
----------------	--

17-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА
9 - 16 июля 2006
Río Cuarto – Республика Аргентина



Общие замечания к практическому тесту

ДОРОГИЕ УЧАСТНИКИ

Практический тест проводится в различных лабораториях.

№ 1- Анатомия, систематика и физиология растений

№ 2- Анатомия, экология и систематика животных

№ 3- Биохимия

№ 4- Микробиология

- Вам предоставляется **1 час** на лабораторные работы № 1 и № 2
- Вам предоставляется **1 час 30 минут** на лабораторные работы № 3 и № 4.
- Максимальное количество баллов за каждую лабораторную работу составляет **40 баллов**, то есть 160 баллов за весь практический тест.

Желаем успеха !!!!!!!

Практический тест

МИКРОБИОЛОГИЯ

Существуют различные системы классификации бактерий, но наиболее часто используется система, опубликованная в «Руководстве по определению бактерий Берги».

Ниже представлена рабочая схема идентификации штамма бактерий, исходя из биохимической точки зрения:

- 1) Изолирование штамма и получение его чистой культуры.
- 2) Микроскопирование живых клеток и окрашенных по Граму мазков. Таким образом, определяется морфология изучаемого микроорганизма и его окраска по Граму. Также важно определить присутствие групп, спор и любых других черт, которые могли бы быть интересными.
- 3) Определение особенностей питания (как правило они следуют из методов, использованных ранее при изолировании и культивировании): фотоавтотрофы, фотогетеротрофы, хемоавтотрофы, хемогетеротрофы.
- 4) Проведение первичных тестов. Следующая группа тестов, называемых первичными тестами, используется для определения рода, группы родов, и, в некоторых случаях, семейства, к которому принадлежит изолированный организм. К первичным тестам относятся, помимо окраски по Граму и морфологических наблюдений, определение каталазы, оксидазы, сбраживания глюкозы, а также наряду с иными, установление подвижности.

Реактивы и оборудование

1. Капельница с раствором генцианового фиолетового (готов к использованию)
2. Капельница с раствором Люголя (готов к использованию)
3. Капельница с раствором для обесцвечивания (готов к использованию)
4. Капельница раствором сафранина (готов к использованию)
5. Капельница с дистиллированной водой
6. 1 штатив для пробирок

7. 2 пробирки, содержащие культуры организмов А и В, выращенных на среде Лурия-Бертани.
8. 2 пары лабораторных перчаток
9. Респираторная маска
10. Маркерный карандаш
11. Бумажная салфетка
12. 1 горелка Бунзена
13. Микроскоп
14. Петля
15. 4 предметные стекла
16. Подставка с держателем для стекол
17. 1 пластиковая бутылка с водой для промывания
18. 1 одноразовый стакан
19. 1 капельница с иммерсионным маслом
20. 1 капельница с 3% раствором H_2O_2
21. 2 чашки с агаризованной средой Лурия-Бертани, инокулированной организмами А и В.
22. 1 Эппендорф-пробирки с 2 оксидазными дисками
23. 1 пинцет
24. 2 пробирки
25. 1 пробирка с пробкой, содержащая стерильную дистиллированную воду.
26. 1 пластиковая пипетка Пастера.
27. 3 чашки с агаризованной средой ЕМВ, содержащей еозин и метиленовый синий (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
28. 3 пробирки с фенилаланином (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная).
29. 1 капельница, содержащая 10% раствор хлористого железа
30. 3 пробирки со средой SIM (сероводород, индол и служащей для определения подвижности) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
31. 1 капельница с индоловым реагентом

32. 3 пробирки, содержащие бульон с мочевиной (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
33. 3 пробирки со средой МЮ (содержащей индол и орнитин и служащей для определения подвижности) (одна из них инокулирована организмом А, другая инокулирована организмом В и последняя не инокулированная)
34. Часы, находящиеся в поле зрения всех студентов в лаборатории.

Предостережение:

Будьте внимательны в обращении со средами и реактивами, так как предоставленные их количества позволяют провести этот практический тест только один раз.

При небрежной работе, делая резкие движения, вдали от горелки, вы можете инфицировать среду, таким образом, препятствуя получению хороших результатов.

Вы проведете биохимические тесты, основа и интерпретация которых описаны в деталях ниже, с использованием питательных сред, реактивов, а также предоставленной бактериологической информации (схемы и диаграммы)

Примечание: Не выбрасывайте пробирки с организмами А и В. Вы будете использовать их в задании 2.

ЗАДАНИЕ 1: Окрашивание организмов А и В по Граму.

ХОД РАБОТЫ

Введение:

Окраска по Граму различает два главные типа бактериальных клеточных стенок. Некоторые виды бактерий из-за химической природы их клеточных стенок имеют свойство задерживать кристаллический фиолетовый даже после обработки органическим обесцвечивающим веществом, представляющим собой смесь ацетона и спирта.

Техника окраски по Граму

1. Приготовьте тонкий мазок материала для изучения и дайте ему высохнуть на воздухе.
2. Зафиксируйте материал на стекле, чтобы он не был смыт при процедуре окрашивания, проводя его три или четыре раза через пламя горелки Бунзена.
3. Поместите мазок на подставку для окраски и покройте поверхность раствором генцианового фиолетового.
4. После 30 секунд выдержки в растворе генцианового фиолетового тщательно промойте препарат проточной водой.
5. Затем покройте мазок раствором иода по Граму (раствором Люголя) на 30 секунд.
6. Держа препарат большим и указательным пальцем, покройте поверхность несколькими каплями спиртового раствора ацетона для обесцвечивания до исчезновения фиолетового цвета. Обычно для этого требуется 10 секунд или менее.
7. Промойте препарат проточной водой и опять поместите его на подставку для окраски. Залейте поверхность раствором сафранина для контрастного окрашивания на 20 секунд. Промойте препарат проточной водой.
8. Поместите мазок в вертикальном положении на подставку для окрашивания,, позволяя стечь избытку воды, и высушите мазок.
9. Рассмотрите окрашенный мазок при увеличении 100х под маслом с иммерсионным объективом микроскопа.
10. Когда вы сфокусируете микроскоп, позовите ассистента.

Результат

ВЫБЕРИТЕ ПРАВИЛЬНЫЙ ОТВЕТ, ВНЕСЯ ЕГО В СООТВЕТСТВУЮЩУЮ КЛЕТКУ

Организм	Окраска по Граму		Проверка ассистентом
А	положительная	отрицательная	
В	положительная	отрицательная	

Вопрос

Вариабельность по Граму

- А)** Это термин, который может быть применен, если наблюдаются две реакции по Граму из-за ошибки при окраске образца.
- В)** Применяется к организму, который меняет структуру своей клеточной стенки от грам-положительного типа до грамотрицательного типа с возрастом культуры.
- С)** Применяется в том случае, когда клетки в культуре грамположительной бактерии теряют способность удерживать первичный краситель во время процесса обесцвечивания.
- Д)** Указывает на смешанную (т.е. нечистую) культуру.

Впишите букву, соответствующую правильному ответу на пунктирную линию ниже:

.....

ЗАДАНИЕ 2: Биохимическая характеристика организмов А и В.

В этой части практической работы вы будете определять при помощи метаболических тестов (уже предоставленных вам или проведенных вами) семейство и род двух организмов, обозначенный А и В.

Реакция на каталазу:

Некоторые бактерии содержат флавопротеины, которые восстанавливают кислород с образованием перекиси водорода (H_2O_2) или супероксида (O_2^-), которые чрезвычайно токсичны, поскольку являются мощными окислителями, способными разрушить клеточные компоненты в короткое время. Многие бактерии содержат ферменты,, предоставляющие защиту против этих токсических соединений.

Методика

Проведите тест на каталазу у организмов А и В добавлением 2 капель H_2O_2 к бактериальной суспензии (3 петли жидкой культуры, подписанной LB-A и LB-B), помещенных на предметные стекла.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Какая реакция осуществляется ферментом каталазой?

- 1) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
- 2) $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- 3) $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- 4) $4 \text{O}_2^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 3 \text{O}_2$

Впишите номер, соответствующий правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....**2**.....

Оксидазная реакция:

Тест используется для обнаружения фермента цитохром-с-оксидазы, который присутствует у различных родов, e.g. *Pseudomonas* spp., *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp.

Оксидазные диски содержат диметил-пара-фенилендиамин, который является субстратом фермента цитохром-с-оксидазы.

Организмы, обладающие этим ферментом, в присутствии атмосферного кислорода и субстрата, содержащегося на оксидазных дисках, приводят к образованию пурпурно-фиолетовой окраски.

Методика

Проведите оксидазный тест на организмах А и В в соответствии с последующими инструкциями.

Оксидазный тест проводится с использованием пробирок. Приготовьте из чистой культуры густую суспензию в 0,2 мл стерильной дистиллированной воды и добавьте один оксидазный диск.

Примечание: приготовьте бактериальную суспензию из 3-х колоний из чашек, соответственно помеченных LB-A и LB-B.

Результаты

Как правило, положительный результат наблюдается при комнатной температуре в течение первой минуты. Запоздавшая реакция, очевидная после 2 минут, должна рассматриваться как отрицательный результат.

Положительный: диски показывают пурпурно-фиолетовую окраску.

Отрицательный: нет изменений в цвете дисков.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

АГАР (ЕМВ), СОДЕРЖАЩИЙ ЭОЗИН И МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ

Эта среда используется для селективного изолирования быстрорастущих и не обладающих особенными питательными потребностями грамотрицательных бактерий.

Она поддерживает рост всех представителей Enterobacteriaceae.

Цель

Эта среда объединяет пропись Холта-Харриса и Левайна с целью улучшения селективного изолирования Enterobacteriaceae и других грамотрицательных видов бактерий.

Установление различия между организмами, сбраживающими лактозу и/или сахарозу, и между организмами, не сбраживающими их, возможно благодаря присутствию индикаторов эозина и метиленового синего. Кроме того, эти индикаторы ингибируют рост некоторых грамположительных бактерий.

Колонии многих штаммов *Escherichia coli* и *Citrobacter spp.* приобретают на этой среде зеленоватый металлический блеск.

Организмы, сбраживающие лактозу и/или сахарозу, образуют колонии с темным центром, окруженным голубым или розовым цветом, в то время как организмы, не сбраживающие лактозу и/или сахарозу, образуют бесцветные колонии.

Эта среда также способствует росту не только представителей Enterobacteriaceae, но и других организмов, которые как правило могут быть различены по внешнему виду их колоний.

Инструкции

Используя предоставленные чашки со средой EMB (обозначенные как EMB-A и EMB-B соответственно для организмов А и В), определите потребление сахарозы и/или лактозы организмами А и В.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Брожение

- А)** приводит к образованию кислоты и возможно газа в следствие распада сахаров.
- В)** связано с типом роста факультативных анаэробов в тиогликолатной среде, где рост проявляется меньшей плотностью в анаэробном регионе.
- С)** как правило связано с положительной реакцией на каталазу у организма.

Впишите букву, соответствующую правильному ответу на пунктирную линию ниже:

.....**А В**.....

Фенилаланиновый агар (Пробирки обозначены Ph)

Фенилаланиновый агар рекомендуется для обнаружения образования фенилпировиноградной кислоты из фенилаланина при дезаминировании.

Положительная реакция приводит к образованию зеленой окраски при добавлении 10% раствора хлорида железа.

Инструкции

Добавьте 4 или 5 капель раствора хлорида железа к косякам с фенилаланиновым агаром (обозначенным Ph-A и Ph-B соответственно). После добавления реагента поворачивайте пробирку. Интенсивная зеленая окраска, проявляющаяся в течение 10 минут, указывает на присутствие фенилпировиноградной кислоты.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Среда (SIM) (сероводород, индол, подвижность) (Пробирки обозначены SIM A и SIM B)

Эта среда используется для определения образования сероводорода и индола и обнаружения подвижности в одной и той же пробирке. Образование сероводорода на этой среде происходит из тиосульфата или сульфатредуктаз, а не от действия цистеиндесульфогидраз. Любое почернение вдоль линии инокуляции рассматривается как положительная реакция на сероводород, которая обычно появляется между 18 и 24 часами после посева. Подвижные культуры в среде SIM показывают диффузный рост вдали от линии инокуляции. Это подходящая среда для обнаружения характерного для листерий "подобного зонтику" движения. Высокое содержание триптона в этой среде делает ее очень пригодной для обнаружения образования индола.

Инструкции

Используя предоставленные пробирки (обозначенные SIM-A и SIM-B для организмов А и В соответственно), определите образование сероводорода и индола, а также подвижность организмов А и В.

Для обнаружения образования индола добавьте 5 капель реактива (обозначенного как **indole**) к плотному росту, полученному в пробирке со средой SIM. Быстро развивающаяся розовая окраска указывает на присутствие индола.

Замечание: Впишите полученный результат в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Вопрос

Отрицательный результат при определении подвижности

- A)** обнаруживается, когда рост появляется только вдоль линии, где произошла инокуляция среды уколом.
- B)** должен быть подтвержден на молодой жидкой культуре того же организма.
- C)** может показывать рост на поверхности среды.
- D)** может встречаться у строго аэробных, подвижных организмов.

Впишите букву/ы, соответствующую/ие правильному/ым ответу/ам, на пунктирную линию ниже:

..... **A - D**

БУЛЬОН С МОЧЕВИНОЙ

Эта среда применима для дифференцирования организмов, синтезирующих уреазу.

Инструкции

Используя пробирки с бульоном с мочевиной (обозначенные как UREA-A и UREA-B для организмов А и В соответственно), определите образование уреазы организмами А и В.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

ЦИТРАТНЫЙ АГАР СИММОНСА

Эта среда способна выявить различия между организмами, содержащими ферменты цитратпермеазы, и организмами, не содержащими таких ферментов.

Инструкции

Используя предоставленные пробирки с цитратным агаром Симмонса (обозначенные как SC-A и SC-B для организмов А и В соответственно), определите наличие роста для организмов А и В.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов, используя + (присутствие роста) и – (отсутствие роста).

Среда (MIO) (подвижность, индол, орнитин)

На этой среде наблюдаются следующие реакции:

- Декарбоксилирование орнитина (ODC). Наблюдайте в нижних трех четвертях среды (анаэробная область) за изменением в цвете индикатора pH; для правильного анализа результатов рост должен происходить в этой части пробирки:
 - Серый, голубой или пурпурный цвет: положительная реакция на декарбоксилирование орнитина – образование сильно щелочного продукта, нейтрализующего кислоту, образующуюся при сбраживании глюкозы.
 - Желтый цвет: отрицательная реакция. Желтый цвет соответствует "необразованию" кислоты при сбраживании глюкозы

Инструкции

Используя пробирки со средой MIO (обозначенные как MIO-A и MIO-B для организмов А и В соответственно), определите у организмов А и В образование фермента орнитиндекарбоксилазы.

Замечание: Впишите полученные результаты в таблицу биохимических тестов, используя + (для положительной реакции) и – (для отрицательной реакции)

Результаты:

Впишите результаты биохимических тестов в следующую таблицу

организм	Каталаза	лактоза	Сахароза	Подвижность	индол	SH ₂	фенилаланин	ODC	уреаза	цитрат	Оксидаза
A											
B											

Используя таблицы в дополнении, укажите

	Семейство	Род
Организм А		
Организм В		

Вопросы

1. Вы имеете культуры пяти организмов, как перечислено ниже. Однако подписи на пробирках отпали и вам необходимо заново правильно подписать пробирки! Вначале вам необходимо рассмотреть различные реакции, известные вам для организмов, которые обозначены вопросительным знаком:

род	Окраска по Граму	форма	Каталазная реакция	Сбраживание глюкозы	Сбраживание лактозы	Фенилаланиндеаминаза	Использование цитрата
<i>Bacillus</i>	+	Палочка	+	+ или –	?	?	?
<i>Staphylococcus</i>	+	кокк	+	+	?	?	?
<i>Enterobacter</i>	–	Палочка	+	+	+	–	+
<i>Morganella</i>	–	Палочка	+	+	–	+	–
<i>Pseudomonas</i>	–	Палочка	+	–	–	–	?

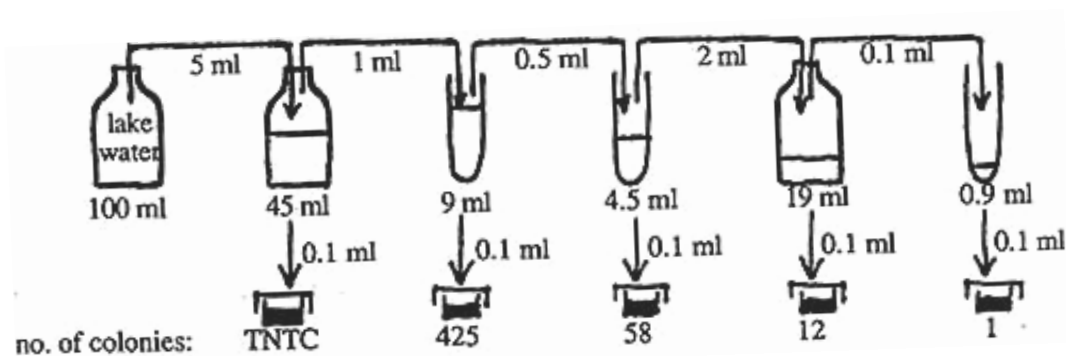
а. Результаты какого специфического лабораторного теста позволят различить *Bacillus* от *Staphylococcus* а также от трех остальных родов?

- A) Сбраживание глюкозы
- B) Использование цитрата
- C) Каталазная реакция
- D) Окраска по Граму

Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....

2. Рассмотрите следующую схему разведений:



а. Сообщите общее число колониобразующих единиц (cfu) в 100 мл исходного образца озерной воды. (TNTC=слишком высокая плотность бактерий, чтобы проводить подсчет)

- A) $5,8 \cdot 10^7$ cfu / 100 мл
- B) $4,25 \cdot 10^7$ cfu / 100 мл
- C) $1,2 \cdot 10^8$ cfu / 100 мл

Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....**A**.....

- b. Ожидаете ли Вы каких-либо изменений в ответе на изложенную выше проблему, если бы первое разведение было произведено добавлением одного мл образца к 9 мл растворителя?

A) Yes

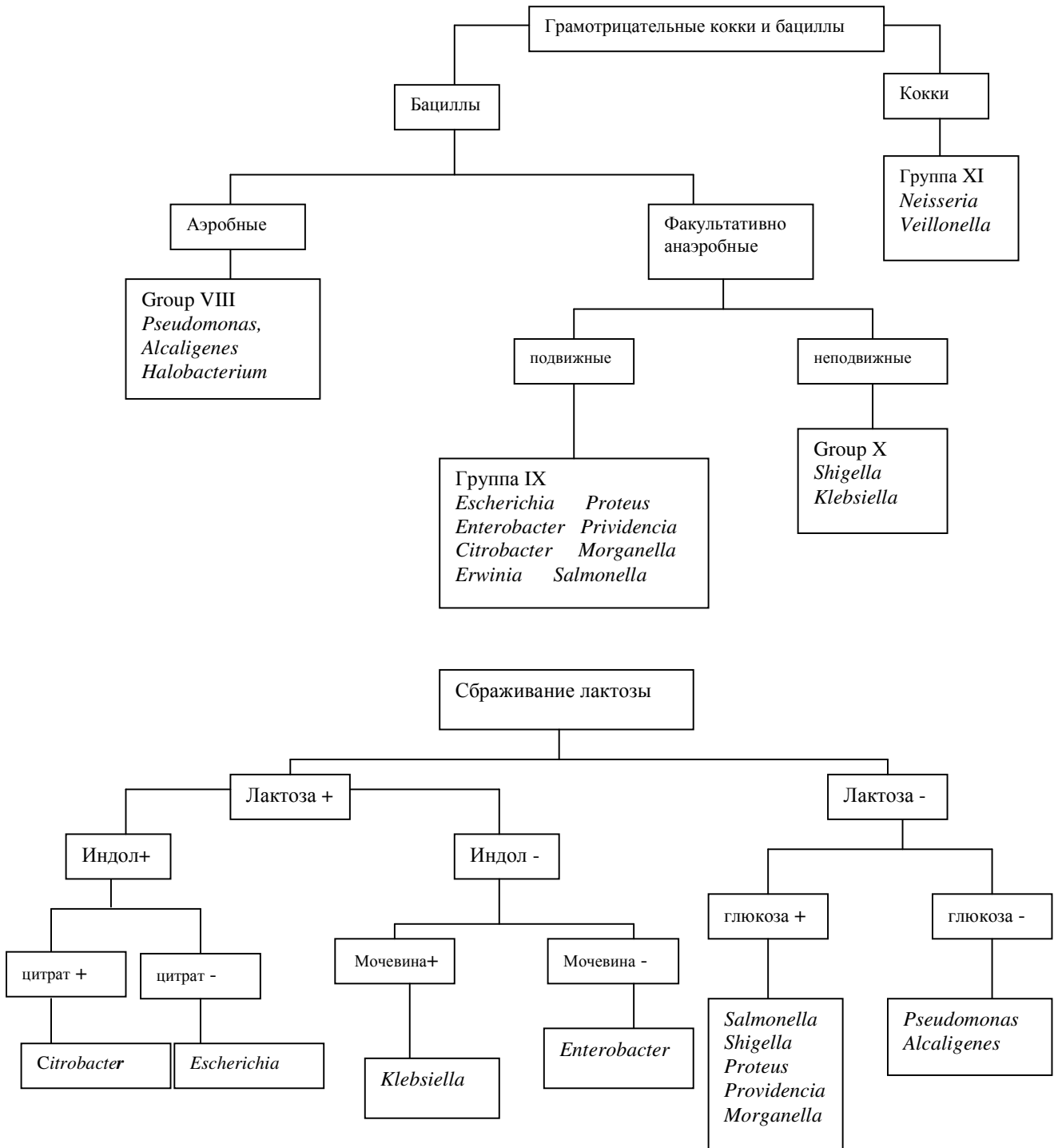
B) No

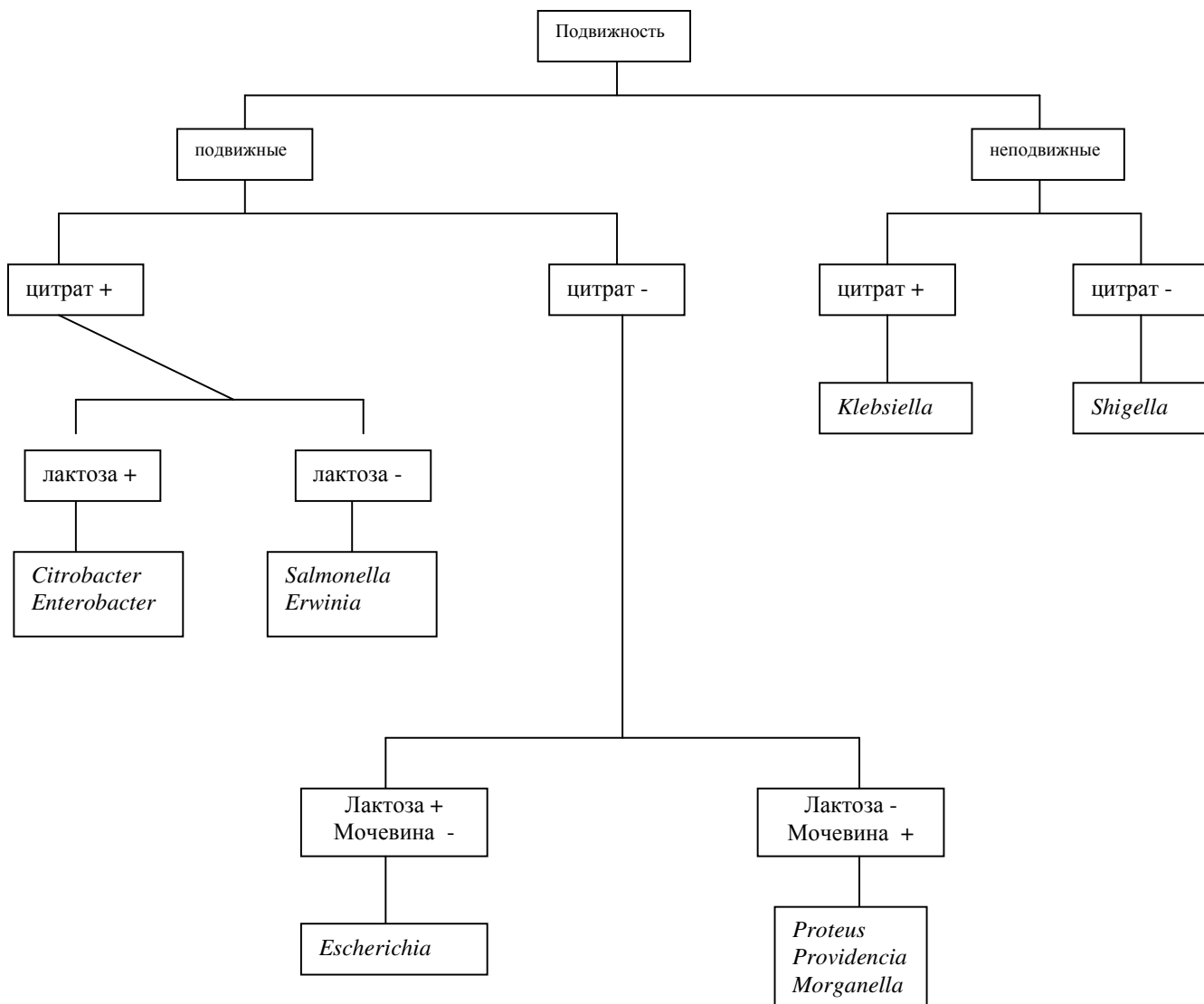
Впишите букву, соответствующую правильному ответу, на пунктирную линию ниже:

.....**B**.....

Дополнение 1

Окраска по Граму (свежая культура)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
форма	кокк	кокк	кокк	кокк	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	палоч-ка	кокк
образование групп	класте-ры	класте-ры	цепоч-ки	тетра-ды									пары
аэробный рост	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
анаэробный рост	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
подвижность	-	-	-	-	-	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+ или -	+	-
каталаза	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
оксидаза									+	+	-	+	+
Сбраживание глюкозы до кислоты и/или кислоты и газа	-	+	+	+	+	+ (или -)	+	-	-	-	+	+	-
<i>Micrococcus</i>	X												
<i>Staphylococcus</i>		X											
<i>Streptococcus</i>			X										
<i>Lactococcus</i>			X										
<i>Enterococcus</i>			X										
<i>Clostridium</i>						X							
<i>Bacillus</i>							X	X					
<i>Alcaligenes</i>									X				
<i>Pseudomonas</i>										X			
<i>Enterobacterias</i>											X		
<i>Aeromonas</i>												X	
<i>Chromobacterium</i>												X	
<i>Neisseria</i>													X





Семейство	Род	окисление										
		каталаза	лакто- зы	сахарозы	подвижность	индол	SH ₂	фенил-аланин	ODC	уреаза	цитрат	оксидаза
Escherichieae	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Shigella</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Salmonellaeae	<i>Salmonella</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	<i>Citrobacter</i>	+	+ / -	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Proteeae	<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+ / -	+	+	+	+	+ / -	-
	<i>Morganella</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Klebsielleae	<i>Enterobacter</i>	+	+	+ / -	+	-	-	-	+	+ / -	+	-
	<i>Serratia</i>	+	+ / -	+ / -	+	-	-	-	+ / -	+	+	-
	<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+ / -	-
Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	+	?	-	+	-	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+