

Manual of Methods for General Bacteriology

PHILIPP GERHARDT, Editor-in-Chief

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

R. G. E. MURRAY, Editor, I. Morphology

Department of Microbiology and Immunology
University of Western Ontario, London, Ont., Canada N6A 5C1

RALPH N. COSTILOW, Editor, II. Growth

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

EUGENE W. NESTER, Editor, III. Genetics

Department of Microbiology,
University of Washington, Seattle, WA 98195

WILLIS A. WOOD, Editor, IV. Metabolism

Department of Biochemistry, Michigan State University,
East Lansing, MI 48824

NOEL R. KRIEG, Editor, V. Systematics

Biology Department, Virginia Polytechnic Institute,
Blacksburg, VA 24061

G. BRIGGS PHILLIPS, Editor, VI. Laboratory Safety

Health Industry Manufacturers Association, 1030 15th Street, N. W.,
Washington, DC 20005

American Society for Microbiology Washington, DC 20006 1981

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

3

Под редакцией
Ф. ГЕРХАРДТА и др.

Перевод с английского под редакцией
чл.-корр. АН СССР Е. Н. КОНДРАТЬЕВОЙ
и проф. Л. В. КАЛАКУЦКОГО

МОСКВА «МИР» 1984

ББК 28.4
М 59
УДК 576.80.85

М 59 **Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1984. — 264 с., ил.**

Фундаментальное руководство, написанное учеными США и Канады, по методам, широко используемым в современной бактериологии. На русском языке книга выходит в трех томах. В третьем томе рассматриваются систематика и идентификация микроорганизмов, приемы, обеспечивающие безопасность работы в лаборатории, а также методы разведения и определения количества биомассы.

Предназначена для специалистов, работающих во всех областях микробиологии.

М $\frac{2003000000-385}{041(0)-84}$ Свод. пл. подписных изданий, 1983

ББК 57 А

Редакция литературы по биологии

© 1981 American Society for Microbiology

© Перевод на русский язык, «Мир», 1984

Часть V

СИСТЕМАТИКА

ВВЕДЕНИЕ

Н. Криг

В систематике бактерий можно выделить три взаимосвязанных аспекта: первый — это *классификация* — распределение по группам бактерий со сходными фенотипическими или генетическими характеристиками; второй — *номенклатура* — наименование бактерий в соответствии с международными принципами, правилами и рекомендациями [3], которые обеспечивают точное взаимопонимание бактериологов, работающих с различными бактериями, и третий — *идентификация* — сравнение неизвестных организмов с уже классифицированными бактериями с целью установления идентичности или наименования неизвестных организмов. Систематика требует прежде всего как можно более широкого изучения характеристик бактерий с последующим решением вопроса о том, как следует разделить или сгруппировать бактерии. Надежные схемы идентификации неизвестных организмов можно разработать только после того, как бактерии охарактеризованы и расклассифицированы. Так, систематика стремится установить порядок среди хаоса и расположить множество бактериальных видов в последовательной, ясной и удобной для использования форме.

Основной единицей в систематике является *вид*. В бактериологии под видом обычно понимают типовой штамм и все остальные штаммы, считающиеся достаточно сходными с типовым штаммом, для того чтобы принадлежать к данному виду. *Типовой штамм* — это штамм, выбранный в качестве постоянного образца того, что подразумевается под данным видом, хотя он и не всегда является наиболее типичным представителем этого вида. Все остальные штаммы, которые могут быть отнесены к этому виду, следует сравнивать с типовым

штаммом данного вида. Культуры типовых штаммов можно приобрести в различных коллекциях, например в Американской коллекции типовых культур (Роквилл, шт. Мэриленд) или в Национальной коллекции типовых культур (Лондон, Англия).

Выражение «достаточно сходными» из приведенного выше определения бактериального вида является источником большинства затруднений в классификации бактерий, так как то, что один человек считает достаточно сходным, не обязательно представляется таковым для другого. Однако совершенно очевидно: чем больше известно о какой-то группе бактерий, тем более вероятно, что различные исследователи смогут прийти к одной приемлемой схеме классификации. Исторически сложившийся способ характеристики бактерий заключается в качественном описании как можно большего числа фенотипических признаков, основанных на морфологии, структуре, культивировании, питании, биохимии, метаболизме, патогенных и антигенных свойствах и экологии. Рутинные и специальные тесты для выявления многих из этих признаков описаны в гл. 20. Методы нумерической таксономии, приведенные в гл. 21, полезны для количественного определения сходства на основе фенотипических признаков; они могут помочь в достижении объективности, которая иногда отсутствует в тех случаях, когда бактерии классифицируют по интуиции. Фенотипическое сходство не обязательно означает филогенетическую связь или родственность (общность происхождения), однако в последние годы появились методы, основанные на гомологии нуклеиновых кислот, позволяющие группировать бактерии по степени их родства. Эти методы, описанные в гл. 22, позволяют сравнивать бактерии по нуклеотидным последовательностям их ДНК или РНК.

Никакой официальной, или принятой в международном масштабе, схемы классификации бактерий не существует, но наиболее популярной и широко применяемой является схема, приведенная в «Определителе бактерий Берги» [1]. Недавно был издан сокращенный вариант «Определителя бактерий Берги», специально предназначенный для целей идентификации [2]. Полезность этого руководства определяется несколькими

факторами: 1) только в «Определителе Берги» охвачены все известные роды и виды бактерий, 2) он создан при участии многих специалистов, хорошо знакомых с отдельными группами бактерий, 3) предусмотрено, что по мере получения новой информации в дальнейшие издания будут вноситься изменения и исправления, и 4) в нем содержатся таблицы и ключи, полезные для идентификации бактерий.

Методы, описанные в последующих главах этого раздела, были отобраны с учетом их привлекательности и полезности для специалистов, имеющих мало опыта в систематике бактерий, но желающих освоить эту область бактериологии. При этом основное внимание уделяется практическому использованию методов, а не лежащим в их основе принципам и теоретическим соображениям. Однако для тех, кто желает продолжить изучение излагаемой темы, в конце каждой главы приводится список общей и специальной литературы.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Buchanan R. E., Gibbons N. E. (ed.). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1974.*
- 2 *Holt J. G. (ed.). The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1977. [Имеется перевод: Дж. Хоулт (ред.). Краткий определитель бактерий Берги. — М.: Мир, 1980.]*
- 3 *LaPage S. P., Sneath P. H. A., Lessel E. F., Skerman V. B. D., Seeliger H. P. R., Clark W. A. (ed.). International code of nomenclature of bacteria, American Society of Microbiology, Washington, D. C., 1975. [Имеется перевод: Лапаж С. П., Снис П. Х. А., Лессел Э. Ф., Скерман В. Б. Д., Силигер Х. П. Р., Кларк В. А. (ред.). Международный кодекс номенклатуры бактерий. — М.: Наука, 1978.]*

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Р. Смайберт, Н. Криг

Ниже приведены некоторые предварительные замечания, относящиеся вообще ко всем методам, используемым для характеристики бактерий. Наиболее важное из них состоит в том, что всегда следует использовать только чистые культуры. Это может показаться самоочевидным, однако «сюрпризы», встречающиеся при выделении чистой культуры, не всегда можно предугадать заранее. Однократный отбор колонии с чашки и перенос ее на другую среду не всегда гарантирует чистоту. Например, колонии слизиобразующих бактерий могут содержать в виде примеси другие микроорганизмы, захваченные со слизью; культуры актиномицетов или различных видов *Bacillus* могут быть заражены контаминантами, случайно попавшими в полости между цепочками клеток. Трудности возникают также и при выделении культур на селективной среде. В этом случае контаминанты могут существовать в латентном состоянии и вызывать заражение при отборе и пересеве колоний. Наилучшая очистка достигается на неселективной среде. Но даже в этом случае колонии не следует отбирать слишком рано, так как возможно присутствие медленно растущих контаминантов. Методы получения чистых культур описаны в гл. 8.

В процессе длительного исследования группы штаммов чистые культуры могут претерпевать генетические изменения. Поэтому культуры, используемые в конце исследования, могут содержать несколько измененные организмы по сравнению с теми, которые изучались вначале. При условии правильного хранения культур с самого начала работы можно всегда иметь источник организма с первоначальными свойствами (методы хранения культур приведены в гл. 12).

При определении того, к какой из основных групп вероятнее всего относится новый изолят, некоторые об-

щие признаки представляются наиболее важными. Исследователь должен выяснить, является ли организм фототрофным, хемоавтотрофным или хемогетеротрофным, а также является ли он аэробом, анаэробом, микроаэрофилом или факультативным аэробом. Необходимо определить некоторые морфологические свойства, окраску по Граму и форму клеток (палочковидная, кокковидная, вибриоидная, спиралевидная и т. д.). Важны также специфические морфологические признаки, если они имеются, например наличие эндоспор, экзоспор, капсул, цист, стебельков или других отростков, плодовых тел, или такие свойства, как кислотоустойчивость, скользящая подвижность, истинное ветвление и способность к размножению почкованием. Взаимное расположение клеток также может иметь значение; например, как располагаются кокки: в виде цепочек или неравномерных скоплений. Весьма важными являются три физиологических теста: на оксидазу, каталазу и определение способности к аэробному или анаэробному катаболизму сахаров (О/Ф-тест). Если известны особые физиологические свойства, присущие микроорганизму, то это облегчает его идентификацию (например, способность к азотфиксации, деградации целлюлозы, биолюминесценции, потребность в морской воде для роста, образование пигментов или потребность в геме).

Желательно использовать упорядоченный подход к идентификации, основанный на здравом смысле и на применении только тех тестов, которые имеют отношение к делу. Следует избегать подхода, который можно сравнить с «тыканьем пальцем в небо», когда применяют все виды тестов в отчаянной надежде на то, что какой-нибудь из них окажется полезным. Чрезвычайно ценными могут оказаться оглавление 8-го издания «Определителя Берги» [2] и приведенные там основные ключи, так же как общее описание различных порядков, семейств и родов бактерий. После исчерпания первоначальных возможностей можно обратиться к подробным ключам и таблицам, приводимым в различных пособиях (многие из них перечислены в списке общей литературы [1—13] в разд. 20.5.1) по идентификации родов и видов. На последних этапах идентификации новый штамм сравнивают либо с типовым штаммом

предполагаемого вида, либо с другим известным штаммом, принадлежность которого к данному виду точно установлена.

Часто (особенно в случаях с патогенными бактериями) проводят быструю предварительную идентификацию до рода или вида с помощью диагностических сывороток. Однако такие тесты бывают не абсолютно специфичными, и обычно для подтверждения полученных с их помощью результатов требуется проведение дополнительных физиологических тестов. Например, агглютинация грамотрицательных кишечных палочек поливалентной сывороткой *Salmonella* является предварительным свидетельством в пользу их принадлежности к роду *Salmonella*, но это обязательно должно быть подтверждено рядом биохимических тестов.

При проведении диагностических тестов организм, используемый для инокуляции, должен быть свежепересевным, в хорошем физиологическом состоянии. Старые накопительные культуры, которые могут содержать в большом количестве мертвые или отмирающие клетки, не пригодны для этих целей. Инокулированную диагностическую среду инкубируют в условиях, оптимальных для жизнедеятельности организмов или для проявления изучаемого свойства (например, оптимальные температура, pH, состав газов и ионный состав). Методы тестирования следует использовать не только в отношении испытуемого организма, но также и в отношении штаммов, для которых наличие или отсутствие проверяемого свойства уже известно. Такой подход обеспечивает проверку надежности реактивов и сред.

В конце этой главы приведены ссылки на общую литературу (20.5.1), где даны схемы идентификации различных групп бактерий, дальнейшая информация по методологии и дополнительные методы характеристики.

20.1. РУТИННЫЕ ТЕСТЫ

20.1.1. Окрашивание на кислотоустойчивость

Методика этого окрашивания описана в разд. 3.3.6. Положительная реакция указывает на *Mycobacterium* или *Nocardia*.

20.1.2. Образование кислот из углеводов

Метод 1. При подготовке среды в нее вводят рН-индикатор. В табл. 20.1 перечислены наиболее часто используемые индикаторы с указанием их свойств.

Метод 2. В случаях, когда индикатор токсичен для бактерий или разлагается в процессе их роста, его следует добавлять каплями (0,02—0,04 %-ного спиртового раствора) в культуру после окончания роста.

Метод 3. Если применение индикатора нежелательно в силу этих же причин, а также для обеспечения более высокой точности, рН культуры следует измерять по окончании роста с помощью рН-метра. Используют длинный тонкий рН-электрод, который можно вводить прямо в пробирку с культурой. К верхней части электрода прикрепляют плоскую резиновую прокладку с большим диаметром, чем диаметр пробирки с культурой, так чтобы кончик электрода был застрахован от удара о дно пробирки. При определении рН нескольких культур патогенных бактерий между измерениями электрод погружают в стакан с дистиллированной водой. Позже эту воду автоклавируют. По окончании работы электрод промывают дезинфицирующим раствором (например, 3 %-ной перекисью водорода или 70 %-ным этиловым спиртом).

В случае когда анаэробные бактерии культивируют в предварительно восстановленном пептонно-дрожжевом бульоне (разд. 20.3.28) с углеводами, двуокись углерода, которую пропускают через пробирку во время инокуляции для предотвращения попадания кислорода, обычно снижает рН среды до 6,2—6,4. Вследствие этого культуры, выращиваемые на углеводном пептонно-дрожжевом бульоне, обычно считаются подкисленными, если их рН составляет 5,5—6,0 (слабая кислота) или оказывается ниже 5,5 (сильная кислота). Для культур, выращенных на пептонно-дрожжевом бульоне, содержащем арабинозу, рибозу или ксилозу, рН 5,7 или ниже обычно означает подкисление, поскольку стерильная среда, через которую пропускали двуокись углерода, после 1—2 дней инкубации имеет рН 5,9 [7]. В любом случае в качестве контроля следует определять рН

культур в пептонно-дрожжевом бульоне, не содержащем никаких углеводов, так как в некоторых случаях могут образовываться кислоты из пептонов.

20.1.3. Гидролиз эскулина

Культуры выращивают в бульоне или на агаровой среде с добавлением 0,01% эскулина и 0,05% лимоннокислого железа. Положительный тест: появление коричневато-черной окраски среды. Примеры: положительный результат — *Streptococcus faecalis*; отрицательный — *Streptococcus mitis*.

20.1.4. Образование аммиака из аргинина

Инокулируют аргининовый бульон (см. разд. 20.3.2 и 20.3.3) и контрольный бульон без аргинина. После инкубации в течение 2—3 дней анализируют культуры в спот-тесте с реактивом Несслера (разд. 20.4.10). Положительная реакция: появление желтой или оранжевой окраски в отличие от контроля. Примеры: положительный результат — *Streptococcus faecalis*; отрицательный — *Streptococcus salivarius*.

20.1.5. Аргининдезиминая

Метод 1. Этот метод широко применяется для дифференциации членов сем. Enterobacteriaceae. Инокулируют основной бульон Меллера (разд. 20.3.23) с добавлением 1% моногидрохлорида L-аргинина (или 2% DL-формы), а также контрольный бульон без аргинина. После инокуляции бульон заливают 10-мм слоем стерильного минерального (вазелинового) масла. Проверяют пробу ежедневно в течение 4 дней. Положительная реакция: фиолетовая или красновато-фиолетовая окраска. При слабой реакции образуется голубовато-серая окраска. Примеры: положительный результат — *Enterobacter cloacae*; отрицательный — *Proteus vulgaris*.

Метод 2. Этот метод пригоден для широкого круга факультативных аэробов. Инокулируют полужидкую среду Торнли, содержащую аргинин (разд. 20.3.32), а также контрольную среду без аргинина. После посева

в столбик уколом средю герметично покрывают слоем стерильного растопленного петролатума и инкубируют. Положительная реакция: изменение окраски от желто-оранжевой до красной в течение 7 дней.

Метод 3 [88]. Этот метод применим для аэробов и факультативно анаэробных бактерий. Готовят густую суспензию бактерий в 0,033 М фосфатном буфере, рН 6,8 (разд. 20.4.16). В течение нескольких минут пропускают через суспензию (4 мл) азот, а затем добавляют 1 мл 0,001 М моногидрохлорида L-аргинина. Снова пропускают через суспензию азот, закрывают пробирки пробками, инкубируют в течение 2 ч и нагревают 15 мин при 100°C. После удаления клеток центрифугированием определяют в надосадочной жидкости аргинин по методу Розенберга и др. [77]: смешивают 1 мл пробы с 1 мл 3 н. NaOH, 2 мл проявляющего раствора (разд. 20.4.4) и 6 мл воды; через 30 мин сравнивают пробирки с контрольной пробой без аргинина, используя колориметр с зеленым светофильтром (540 нм); сравнивают показания с данными, полученными для неинокулированной контрольной пробы, содержащей аргинин. Положительная реакция: исчезновение части или всего аргинина.

20.1.6. Разрыв ароматического кольца [88]

Культуру выращивают на синтетической среде, содержащей 0,1% *n*-гидроксibenзоата натрия в качестве источника углерода, а также на агаризованном дрожжевом экстракте для определения того, является ли фермент конститутивным или индуцибельным. Соскабливают выросшие клетки с агара и суспендируют их в 2 мл 0,02 М трис-буфера, рН 8,0. Встряхивают суспензию с 0,5 мл толуола и добавляют 20 мкмоль (3,5 мг) протокатехоата натрия. Появление желтой окраски в течение нескольких минут означает расщепление ароматического кольца в мета-положении. При отсутствии изменения окраски суспензию встряхивают в течение часа при 30°C. Добавляют 1,0 г (NH₄)₂SO₄, 1 каплю 1,0%-ного нитропруссиды (нитроферрицианида) и 0,5 мл нашатырного спирта (удельный вес 0,880 или 28—30%-ный раствор). Окрашивание в пурпурный цвет оз-

начает наличие расщепления в орто-положении. Примеры: расщепление в мета-положении — *Pseudomonas acidovorans*; расщепление в орто-положении — *Pseudomonas fluorescens*; отрицательный результат — *Escherichia coli*.

20.1.7. Арилсульфатаза

К стерильной жидкой среде добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество стерилизованного фильтрованием 0,08 М раствора дисульфата трикалийфенолфталеина (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio) до конечной концентрации 0,001 М. Оптимальными для синтеза арилсульфатазы являются среды, содержащие в качестве единственного источника серы метионин; такие источники серы, как сульфат, сульфит, тиосульфат или цистеин, могут подавлять синтез фермента [14, 60]. Среду инокулируют и инкубируют в течение 7 дней, затем добавляют по каплям 1 н. NaOH или 1 М Na₂CO₃. Положительная реакция: окраска от бледно-розовой до светло-красной. Неинокулированная контрольная проба при такой же обработке остается бесцветной.

Примеры: положительный результат — *Proteus rettgeri*; отрицательный — *Chromobacterium violaceum*.

20.1.8. Бацитрациновый тест

Используют стерильные имеющиеся в продаже диски для дифференциации, а не определения чувствительности (Difco Laboratories, Detroit, Mich.; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), или стерильные бумажные диски, пропитанные 0,04 ед. бацитрацина (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Диск помещают на поверхность инокулированного кровяного агара (разд. 20.3.7) и инкубируют в течение 24 ч. Положительная реакция: образование вокруг дисков зоны ингибированного роста.

Примеры: положительный результат — *Streptococcus pyogenes*; отрицательный — другие β-гемолитические стрептококки.

20.1.9. Растворение клеток в желчи

Центрифугируют 24-ч культуру, выращенную в 10 мл бульона Тодда — Хевитта (разд. 20.3.33), и надосадочную жидкость переносят в колбу с дезинфицирующим веществом. Клетки суспендируют в 0,5 мл 0,067 М фосфатного буфера, рН 7,0 (разд. 20.4.16). Добавляют 0,5 мл 10%-ного дезоксихолата натрия и инкубируют при 37°C в течение 15—30 мин. Положительная реакция: суспензия становится прозрачной. Примеры: положительный результат — *Streptococcus pneumoniae*; отрицательный — другие α -гемолитические стрептококки.

20.1.10. Устойчивость к желчи

Метод 1. Посев проводят штрихом на желчный агар (разд. 20.3.6) в чашках. Сравнивают рост на среде с желчью с ростом на среде без желчи. Примеры: положительный результат (10 и 40% желчи) — *Streptococcus faecalis*; положительный результат (10, но не 40% желчи) — *Streptococcus salivarius*; отрицательный результат (ни 10, ни 40% желчи) — *Streptococcus dysgalactiae*.

Метод 2. Этот метод используют для анаэробов [7]. Инокулируют пептонно-дрожжевой бульон (разд. 20.3.28), содержащий 2% бычьей желчи и 1% глюкозы, с помощью пастеровской пипетки, пропуская через бульон очищенную от кислорода двуокись углерода. Закрывают пробирки пробками и инкубируют. Наблюдают за ростом и сравнивают его с ростом на среде, не содержащей бычьей желчи.

Примеры: рост — *Bacteroides oralis*; отсутствие роста — *Bacteroides melaninogenicus*.

20.1.11. Гидролиз казеина

Стерильное (автоклавированное) снятое молоко смешивают при 50°C с равным объемом питательного агара двойной концентрации (разд. 20.3.25) или другой не содержащей углеводов агаровой среды при 50—55°C. Чашки с инокулированной штрихом средой инкубируют до 14 дней и проверяют, не образуются ли просветления вокруг зон роста. Результат проверяют с помощью за-

ливки среды 10%-ной HCl. *Примечание:* образование кислоты из лактозы может подавлять гидролиз казеина, поэтому необходимо предварительно диализовать снятое молоко. Примеры: положительный результат — *Bacillus polymyxa*; отрицательный — *Bacillus macerans*.

20.1.12. Тест на каталазу

Метод 1. Посев производят в пробирках на скошенный питательный агар (разд. 20.3.25) или другую среду, не содержащую крови. После инкубации вливают по капле вниз по косяку 1 мл 3%-ной перекиси водорода. Сразу же и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков, которое означает положительную реакцию. Параллельно добавляют несколько капель 3%-ной перекиси водорода к колониям на чашке или к зонам обильного роста, который может наблюдаться на поверхности полужидкой среды или около нее. В случае бульонной культуры к 0,5 мл культуры добавляют 0,5 мл 3%-ной перекиси водорода и наблюдают за постоянным образованием пузырьков. *Примечание:* не следует применять для теста на каталазу среду, содержащую кровь, так как кровь, если ее предварительно не прогреть, имеет каталазную активность (метод 3). Некоторые бактерии (например, молочнокислые) в средах с низкими концентрациями глюкозы или вообще без глюкозы образуют негемовую «псевдокаталазу» [94]. Образование псевдокаталазы можно предотвратить введением в среду глюкозы (1%). При проверке анаэробов на каталазную активность важно перед добавлением перекиси водорода выдержать культуру на воздухе в течение 30 мин.

Примеры: положительный результат — *Staphylococcus epidermidis*; отрицательный — *Streptococcus lactis*.

Метод 2. Этот метод устраняет проблему впитывания, которая может возникать при добавлении перекиси водорода в колонии, растущие в чашках или на косяках. Выросшую культуру снимают с поверхности агара неметаллическим инструментом и суспендируют в капле 3%-ной перекиси водорода на предметном стекле. Немедленно и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков визуально или в микроскоп с малым увеличением.

Метод 3. Метод применяется для определенных бактерий, способных образовывать каталазу только при росте на среде, содержащей гем, например для некоторых молочнокислых бактерий [94]. К стерильной основе кровяного агара (разд. 20.3.31), содержащей 1% глюкозы для ингибирования образования псевдокаталазы, добавляют 5% (по объему) смеси дефибринированной крови (разд. 20.3.7) и стерильной воды (1:1). Среду нагревают при 100 °С в течение 15 мин для инактивации каталазы крови, охлаждают до 45—50 °С и разливают по чашкам. Рост проверяют непосредственно в чашках с помощью 3%-ной перекиси водорода или по методу 2.

20.1.13. Целлюлолитическая активность

Метод 1 [45]. Используемая в этом методе обработка целлюлозы обеспечивает наилучшее определение целлюлолитической активности; другие обработки описаны в работах [12, 13]. Хорошо измельченную целлюлозу вносят в соответствующую агаровую среду, не содержащую углеводов. Чтобы приготовить такую целлюлозу, производят мокрый размол (3%; вес/объем) фильтровальной бумаги Whatman №1 в барабанной мельнице. Помещают 30 г бумаги (разорванной на мелкие кусочки) в фарфоровый барабан (емкостью около 4 л), содержащий 1 л воды, вносят нужное количество кремневой гальки (фарфоровые шарики менее эффективны) так, чтобы вода лишь покрывала осадок; барабан вращается в течение суток со скоростью 74 об/мин до получения очень мелкодисперсной и вязкой суспензии. Вращение следует прекратить до того, как начнет снижаться вязкость и образуются вещества, восстанавливающие медь. [Тест на их наличие проводят с 1 мл суспензии, как описано в разд. 20.1.30, используя 1 мл реактива Бенедикта (разд. 20.4.1).] Положительная реакция: появление зон просветления вокруг колоний на целлюлозном агаре. Может потребоваться инкубация в течение длительного периода.

Примеры: положительный результат — виды *Cellulomonas*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Метод 2. Этот метод менее чувствителен, чем метод 1. Перед автоклавированием полоску фильтроваль-

ной бумаги Whatman № 1 помещают в пробирку с бульоном, не содержащим углеводов. Часть полоски должна выступать выше уровня бульона. Положительная реакция: частичное или полное разрушение полоски бумаги в процессе роста культуры.

20.1.14. Потребление цитрата

Метод 1. Готовят разбавленную суспензию микроорганизмов в стерильной воде или физиологическом растворе. Посевной материал наносят штрихом на косяк цитратного агара Симмонса (разд. 20.3.30). Инкубируют 7 дней. Положительная реакция: появление голубой окраски, означающей использование цитрата в качестве единственного источника углерода.

Примеры: положительный результат — *Enterobacter aerogenes*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Метод 2. Разбавленную суспензию клеток наносят штрихом на всю поверхность косяка цитратного агара Кристенсена (разд. 20.3.11). Инкубируют 7 дней. Положительная реакция: появление красной окраски или окраски цвета фуксина. *Примечание:* положительная реакция означает использование цитрата, но не обязательно в качестве единственного источника углерода, т. е. организм может давать положительную реакцию на агаре Кристенсена и отрицательную — на цитратном агаре Симмонса.

20.1.15. Коагулаза

Одну полную петлю бактериальной массы, снятой со скошенного агара, 0,1 мл бульонной культуры или одну колонию, снятую с агара в чашке, смешивают с 0,5 мл неразведенной плазмы крови кролика или плазмы, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1 : 4. Инкубируют при 37°C и наблюдают через 4 и 24 ч. Положительная реакция: образование плотного или рыхлого сгустка, суспендированного в плазме. Гранулированные или вязкие образования нельзя считать положительным результатом.

Примеры: положительный результат — *Staphylococcus aureus*; отрицательный — *Staphylococcus epidermidis*.

20.1.16. Кокковидные тела

Культуры, поддерживаемые в статическом состоянии (не встряхивавшиеся во время роста) в течение 4 нед, изучают методом фазово-контрастной микроскопии. Кокковидные тела могут обнаруживаться уже на 2-й или 3-й день. Положительная реакция: преобладание круглых преломляющих свет форм с диаметром, превышающим диаметр исходных клеток, и не имеющих утолщенной стенки. Многие формы имеют дискретные темные периферийные участки цитоплазмы, в других случаях клетки выглядят пустыми. Кокковидные тела встречаются у некоторых спирилл, вибрионов и кампилобактеров.

Примеры: положительный результат — *Aquaspirillum itersonii*; отрицательный — *Aquaspirillum serpens*.

20.1.17. Колонии

Измеряют диаметр колоний в миллиметрах, описывают их пигментацию, форму, высоту и вид края, как показано на рис. 20.1. Для рассмотрения краев может потребоваться микроскоп с малым увеличением. Следует описать также поверхность колоний, которая бывает гладкой (блестящей, сверкающей), шероховатой (тусклой, неровной, гранулированной, матовой), мукоидной (слизистой или клейкой на вид). Отмечают степень прозрачности колоний (прозрачные, полупрозрачные или непрозрачные) и их консистенцию при проверке иглой: маслянистую (маслоподобную), вязкую (клейкую) или сухую (хрупкую или порошкообразную). Описывают колонии как молодых, так и старых культур. На характеристики колонии могут влиять среда, возраст культуры, газовый состав среды, степень освещенности и другие условия культивирования.

20.1.18. Цисты и микроцисты

Культуры ежедневно просматривают с помощью фазово-контрастной микроскопии. С возрастом палочковидные клетки приобретают сферическую форму, а стенки клеток утолщаются. Сферические формы могут быть оптически плотными или светопреломляющими. Они не

ФОРМА



ПРОФИЛЬ



КРАЙ



Рис. 20.1. Различные формы, профили и края колоний бактерий. (Приводится в измененном виде из работы [74] с разрешения McGraw-Hill Book Co.)

обладают устойчивостью эндоспор к нагреванию (разд. 20.1.52), за исключением некоторых видов *Nocardia*, но чрезвычайно устойчивы к высушиванию. У *Azotobacter* эти образования называют цистами, у *Mycobacteriales* — микроцистами, термин же «циста» у последних относится к спорангию, содержащему микроцисты, если он имеется. У *Nocardia* сферические образования называют микроцистами или хламидоспорами.

Методы окраски цист описаны в разд. 3.3.8.

20.1.19. Жгутики

Окрашивание жгутиков проводят для исследования с помощью светового (разд. 3.3.10) или электронного микроскопа (разд. 4.1.1 и 4.1.4). Во время окраски сле-

дует как можно меньше встряхивать бактерии, так как жгутики легко отрываются от клеток. При окрашивании жгутиков для световой микроскопии не исключены ошибочные результаты, так как у бактерий с полярно расположенными жгутиками пучок из нескольких жгутиков может иногда выглядеть как один жгутик [97]. Имеют значение и условия культивирования, например некоторые бактерии, такие, как *Vibrio parahaemolyticus*, при росте на жидкой среде образуют один полярный жгутик, а при росте на твердой среде имеют еще и боковые, более короткие жгутики [82]. Некоторые бактерии, например *Listeria monocytogenes*, не способны образовывать жгутики при высокой температуре, тогда как при пониженной они их имеют [50]. В некоторых случаях среды, содержащие глюкозу, могут подавлять образование жгутиков [15].

20.1.20. Флуоресцирующий пигмент

Делают один штрих на чашке со средой В (разд. 20.3.5). Снимают крышки и проверяют чашки через 24, 48 и 72 ч под ультрафиолетовым светом (<260 нм). Можно пользоваться коротковолновой лампой, применяемой для изучения образцов минералов. Чашки не следует продолжать инкубировать после просмотров, поскольку ультрафиолетовый свет оказывает бактерицидное действие. Положительная реакция: флуоресцирующая зона на агаре вокруг участков роста. Флуоресцирующие псевдомонады образуют желто-зеленый пигмент; некоторые виды *Azotobacter*, *Azomonas* и *Beijerinckia* могут образовывать зеленый или белый флуоресцирующий пигменты.

Примеры: положительный результат — *Pseudomonas fluorescens*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.21. Потребность в формиате и фумарате

Этот тест применяют для выявления некоторых анаэробов, которые окисляют формиат и попутно восстанавливают фумарат в сукцинат. Готовят основной формиатно-фумаратный раствор (Ф-Ф) (разд. 20.4.6) и добавляют 1 каплю раствора на 1 мл предварительно

восстановленного пептонно-дрожжевого бульона РУ (разд. 20.3.28) в момент его инокуляции в атмосфере очищенной от кислорода двуокиси углерода. Сравнивают рост на этой среде с ростом на среде без Ф-Ф. Положительная реакция: рост сильно стимулируется Ф-Ф. В некоторых случаях в отсутствие добавок вообще не наблюдается роста.

Примеры: положительный результат — *Bacteroides corrolens*; отрицательный — *Bacteroides oralis*.

20.1.22. β -Галактозидаза [56]

Бактерии культивируют в течение 18 ч при 37°C на скошенном агаре, содержащем три углевода и железо (разд. 20.3.34). Снимают выросшую культуру петлей с косяка и суспендируют в 0,25 мл физиологического раствора (0,85% -ный NaCl) до получения густой суспензии. Добавляют каплю толуола, встряхивают суспензию и инкубируют в течение 5 мин при 37°C. Добавляют 0,25 мл диагностического реактива ОНФГ (разд. 20.4.13). Инкубируют в водяной бане при 37°C и проверяют с интервалами до 24 ч. Следует также приготовить и инкубировать контрольную пробу без клеточной суспензии. Положительная реакция: появление желтой окраски.

Примеры: положительный результат — *Escherichia coli*; отрицательный — *Proteus vulgaris*.

20.1.23. Образование газов из сахаров

Метод 1. Перед автоклавированием бульона с углеводами в пробирку помещают вверх дном стеклянный поплавок ($\approx 10 \times 75$ мм). После автоклавирования он полностью заполняется средой. В случае термолабильных сахаров после автоклавирования и остывания к основной среде с соблюдением правил асептики добавляют их концентрированные растворы, стерилизованные фильтрованием. Пробирки оставляют приблизительно на день для диффузии сахаров в перевернутые поплавки. Среду инокулируют и инкубируют. Положительный результат: накопление газа в поплавке. *Примечание:* если среду перед использованием хранят в холодильнике

ке, а затем инокулируют и инкубируют, растворенные газы в среде могут высвобождаться и накапливаться в поплавах, приводя к ложноположительной реакции. В качестве контроля используют стерильные пробы. Если клетки образуют очень небольшое количество двуокиси углерода, ее трудно обнаружить из-за высокой растворимости и быстрой диффузии в воздух. Такая проблема не возникает при применении методов 2 и 3.

Метод 2. Этот метод совпадает с методом 1 с той лишь разницей, что после инокуляции для предотвращения диффузии двуокиси углерода в воздух в пробирки добавляют ~1 мл стерильного минерального (вазелинового) масла.

Используют содержащую сахар агаровую среду, охлажденную после автоклавирования до 45°C (в случае термолабильных сахаров к основной агаровой среде, расплавленной и охлажденной до 45°C, добавляют концентрированный раствор сахара, стерилизованный фильтрованием). Пробирки инокулируют и позволяют агару затвердеть. Покрывают застывший слой приблизительно 6-мм слоем 2%-ного агара, не содержащего питательных веществ (т. е. агара, приготовленного на воде), а затем тонким слоем стерильного масла. Культуры инкубируют. Положительный результат: разрывы в среде и поднятие слоя агара.

Метод 3 [7]. Этот метод применяют только для анаэробов. Охлаждают расплавленный предварительно восстановленный пептонно-дрожжевой агар РУ (разд. 20.3.27), содержащий 1% глюкозы, до 45°C и инокулируют столбик его 2—3 каплями культуры. Пробирки закрывают стерильной алюминиевой фольгой (не пробками), оставляют до затвердения среды и инкубируют. Положительный результат: образование пузырьков газа в среде или разрывов в агаре.

20.1.24. Гидролиз желатины

Метод 1. Используют бульон, содержащий 12% желатины.

(А) Пробы инкубируют при 20—22°C 6 нед. Положительная реакция: разжижение по крайней мере части среды. При длительной инкубации следует предот-

вратить испарение среды. Примеры: положительный результат — *Proteus vulgaris*; отрицательный — *Escherichia coli*.

(Б) Если температура 22°C слишком низка для роста, культуру инкубируют при оптимальной температуре роста, а затем охлаждают в холодильнике вместе с инокулированной контрольной пробой. Если среда не затвердевает, то это свидетельствует о гидролизе желатины; если же она затвердевает, то ее переносят вместе с контрольной пробой в помещение с комнатной температурой или в термостат с температурой 30°C и инкубируют в наклонном положении около 30 мин. Когда среда в опытной пробе разжижается раньше, чем в контрольной, этот результат расценивается как слабая положительная реакция.

(В) Так же, как в методе Б, но с 4% желатины. Этот метод более чувствителен, чем метод Б.

Метод 2. Этот метод более чувствителен, чем методы 1А или 1Б. Агаровую среду в чашках, содержащую 0,4% желатины, инокулируют штрихом. Инкубируют при оптимальной для роста данного организма температуре. Заливают чашки реактивом, осаждающим желатину [15% HgCl_2 в 20%-ной (по объему) конц. HCl]. Положительная реакция: зоны просветления вокруг колоний.

Метод 3. Это чувствительный метод, дающий возможность быстро получить результат. Бактерии выращивают в пробирке с бульоном, содержащим диски с активированным углем и желатиной (разд. 20.4.3). Положительная реакция: освободившиеся частицы активированного угля могут распределяться по всему объему среды.

20.1.25. Окраска по Граму

Методика окраски по Граму описана в разд. 3.3.5.

20.1.26. Гемолиз

Метод 1. Кровяной агар в чашке засевают штрихом (разд. 20.3.7). Инкубируют при 37°C 24—48 ч. В результате β -гемолиза вокруг колоний образуются проз-

рачные бесцветные зоны. Эритроциты в этих зонах полностью лизируются. В результате α -гемолиза образуется нечеткая зона частично разрушенных эритроцитов, часто с появлением зеленовато-коричневой окраски среды. В результате α' -гемолиза непосредственно вокруг колоний образуется небольшой ореол из целых или частично лизированных эритроцитов, а к нему примыкает зона полного гемолиза, распространяющаяся далее в среду. При визуальном просмотре α' -гемолиз можно спутать с β -гемолизом. *Примечание:* некоторые бактерии, например определенные стафилококки, осуществляют β -гемолиз только в том случае, если чашки с инокулированной средой предварительно инкубируют 48 ч при 37 °С, а затем охлаждают в холодильнике в течение 1 ч (горяче-холодный гемолиз).

Метод 2. Чашку с основой кровяного агара (без добавления крови) инокулируют штрихом. Засеянную среду заливают 10 мл кровяного агара (при 45—50 °С). В данном случае α - или β -гемолиз может быть более четко выражен, чем в методе 1, поскольку колонии погружены в агар и это обеспечивает некоторую защиту гемолитических ферментов (гемолизинов), способных инактивироваться под действием кислорода.

20.1.27. Гидролиз гиппурата

Метод 1. Готовят бульонную среду с добавлением 1,0% гиппурата натрия. После автоклавирования отмечают уровень среды в каждой пробирке. Среду инокулируют и инкубируют 4 дня параллельно со стерильной контрольной пробой. Если среда частично испаряется, в конце инкубационного периода добавляют дистиллированную воду до первоначального уровня. В небольшую пробирку вносят 1,0 мл стерильного контрольного бульона и добавляют порциями по 0,10 мл раствор хлорида железа(III) (12 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл 2%-ной HCl). После каждой добавки пробирку встряхивают. Сначала выпадает осадок гиппурата железа, который после дальнейших добавок хлорида железа(III) растворяется с образованием прозрачного раствора. Определяют наименьшее общее количество хлорида железа(III), которое приводит к растворению осадка. Иссле-

дуюмую бульонную культуру центрифугируют, переливают 1,0 мл надосадочной жидкости в другую пробирку и добавляют к нему раствор хлорида железа(III) в объеме, эквивалентном количеству, определенному ранее для контроля. Положительная реакция: образование плотного устойчивого осадка бензоата железа. Примеры: положительный результат — *Streptococcus agalactiae*; отрицательный — *Streptococcus pyogenes*.

Метод 2 [46]. Этот метод позволяет более быстро проводить определение гидролиза гиппурата. Готовят 1%-ный раствор гиппурата натрия в дистиллированной воде и разливают в пробирки по 0,4 мл. Пробирки, закрытые пробками, хранят в морозильнике при -20°C . Перед экспериментом содержимое пробирок размораживают и смешивают с ним до получения очень густой суспензии полную петлю выросшей культуры, взятой с поверхности твердой среды. Пробирку инкубируют в блочном термостате или в водяной бане при 37°C в течение 2 ч. После инкубации добавляют приблизительно 0,2 мл нингидринового реактива [3,5 г нингидрина растворяют в 100 мл смеси ацетона и бутанола (1:1, по объему)]. Пробирку не встряхивают [35]. Инкубацию продолжают при 37°C в течение 10 мин. Положительная реакция: появление темно-фиолетовой окраски за счет глицина, образующегося при гидролизе гиппурата. Отрицательная реакция: отсутствие окраски или наличие лишь слабого фиолетового оттенка. Следует использовать контрольные пробы с микроорганизмами, для которых реакция уже известна.

20.1.28. Образование сероводорода

Метод 1. Используют длинную пробирку с агаровой средой, содержащей 0,025% цитрата железа(III)-аммония или 0,015% сульфата железа(II). Среда должна содержать источник органической серы (обычно пептон), а также тиосульфат натрия (от 0,008 до 0,03%), так как некоторые бактерии могут образовывать H_2S лишь из одного из этих источников серы. Образование сульфида обычно лучше всего происходит в анаэробных или полуанаэробных условиях, поэтому инокулируют столбики агара. Положительная реакция: почернение

среды во время роста за счет образования сульфида железа (разд. 20.1.54).

Примеры: положительный результат — *Proteus vulgaris*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Метод 2. Этот метод более чувствителен, чем метод 1. Фильтровальную бумагу разрезают на полоски 5×20 мм и погружают в раствор 5%-ного ацетата свинца. Полоски стерилизуют в пробирках, закрытых ватными тампонами, и сушат в сушильном шкафу. Инокулируют пробирку с жидкой средой, содержащей источник серы (см. метод 1). Перед инкубацией в пробирку помещают бумажную полоску так, чтобы ее конец находился приблизительно на 1,3 см выше уровня среды; верхнюю часть полоски можно закрепить ватной или какой-либо другой пробкой. Полоска не должна соприкасаться со средой. Точно так же готовят и неинокулированные контрольные пробирки. Положительная реакция: почернение нижней части полоски после нескольких дней инкубации.

20.1.29. Образование индола

Метод 1. Инокулируют безуглеводную и безнитритную жидкую среду, содержащую источник триптофана (например, 1%-ный триптоновый бульон или среду с 0,1% L-триптофана). Испытывают культуры различного возраста следующим способом: добавляют 1 мл ксилола (или толуола, насыщенного водой), культуру сильно встряхивают для экстрагирования индола и затем оставляют до образования на поверхности слоя ксилола. Держа пробирку наклонно, вливают 0,5 мл реактива Эрлиха (разд. 20.4.5) тонкой струйкой по стенке пробирки до образования слоя между ксилолом и бульоном. Пробы оставляют стоять 5 мин. Положительная реакция: образование красного кольца под слоем ксилола. Проверяют так же контрольную пробу с неинокулированной средой. *Примечание:* если ростовая среда содержит углевод, синтез триптофаназы — фермента, ответственного за образование индола, — может подавляться [21]. Кроме того, обнаружению индола может препятствовать нитрит в концентрации 0,75 мг/мл или выше [87]; по-

этому присутствие нитрата в среде может приводить к ложноположительному результату, если организм способен восстанавливать нитрат до нитрита. Примеры: положительный результат — *Escherichia coli*; отрицательный — *Enterobacter aerogenes*.

Метод 2. Этот метод менее чувствителен, чем метод 1, однако он не требует применения воспламеняющихся и токсичных растворителей. При его применении экстракцию ксилолом не проводят и используют реактив Ковача (разд. 20.4.7), а не Эрлиха. 0,5 мл реактива добавляют в бульонную культуру и пробирку осторожно встряхивают. Положительная реакция: появление красной окраски.

Метод 3. Фильтровальную бумагу разрезают на полоски и опускают в слегка подогретый насыщенный раствор щавелевой кислоты. При охлаждении на полосках образуются кристаллы кислоты. Полоски тщательно высушивают (стерилизация нагреванием необязательна) и перед инкубацией помещают их с соблюдением правил асептики в пробирку с культурой. Полоски не должны соприкасаться со средой, их следует изогнуть так, чтобы они были прижаты к стенке пробирки и оставались около ее отверстия при закрывании ватной пробкой или завинчивающейся крышкой. Положительная реакция: окрашивание в процессе роста культуры бумажной полоски в розовый или красный цвет.

20.1.30. Образование 2-кетоглюконата при окислении глюкозы

Культуру выращивают в бульоне Хейнса (разд. 20.3.15), содержащем 4% глюконата калия (стерилизованного фильтрованием и внесенного с соблюдением правил асептики). В процессе инкубации через различные периоды времени отбирают пробы по 1 мл и добавляют к ним 1 мл реактива Бенедикта (разд. 20.4.1). Смесь нагревают в бане с кипящей водой в течение 10 мин и быстро охлаждают. Положительная реакция: образование желто-коричневого осадка оксида меди. Примеры: положительный результат — *Pseudomonas aeruginosa*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.31. Образование 3-кетолактозы при окислении лактозы [19]

Культуру выращивают на скошенной среде, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 2% CaCO_3 и 1,5—2,0% агара. Выросшую культуру снимают петлей с косяка и помещают в виде небольшой капли диаметром около 5 мм на поверхность лактозного агара в чашке Петри (1% лактозы, 0,1% дрожжевого экстракта, 2% агара). На одной чашке можно проверить от 4 до 6 различных штаммов. После 1—2 дней инкубации поверхность агара заливают тонким слоем реактива Бенедикта (разд. 20.4.1). Положительная реакция: образование желтого кольца оксида меди(I) вокруг зоны роста, достигающего максимальной величины через 2 ч (приблизительно 2—3 см).

Примеры: положительный результат — *Agrobacterium tumefaciens* и *A. radiobacter*; все остальные бактерии, изученные к настоящему времени, дают отрицательную реакцию.

20.1.32. Лецитиназа

Желточный агар (разд. 20.3.14) в чашке засевают штрихом для получения изолированных колоний. Положительный результат: образование мутной (непрозрачной) зоны вокруг колоний. См. также «Липаза» (разд. 20.1.33).

Примеры: положительный результат — *Clostridium perfringens*; отрицательный — *Clostridium butyricum*.

20.1.33. Липаза

Метод 1 [7]. Желточный агар (разд. 20.3.14) в чашке Петри засевают штрихом. После инкубации снимают крышку чашки и внимательно просматривают поверхность при косом освещении. Положительный результат: образование маслянистого блестящего с переливами или перламутрового слоя над колонией и вокруг нее на поверхности агара.

Примеры: положительный результат — *Clostridium sporogenes*; отрицательный — *Clostridium butyricum*.

Метод 2. Этот метод применяют для эфиров пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот [83]. Используют агаровую среду с добавлением 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Стерилизуют твин 40 (эфир пальмитиновой кислоты), твин 60 (эфир стеариновой кислоты) или твин 80 (эфир олеиновой кислоты) автоклавированием при 121°C в течение 20 мин. Добавляют стерильный твин в расплавленную агаровую среду при 45—50°C до конечной концентрации 1% (по объему). Среду встряхивают до полного растворения твина, разливают по чашкам Петри, оставляют до затвердения и засевают штрихом. Положительный результат: появление мутного ореола вокруг колоний. При исследовании под микроскопом видно, что ореолы состоят из кристаллов кальциевого мыла.

Примеры: положительный результат (твин 80) — *Pseudomonas aeruginosa*; отрицательный — *Pseudomonas putida*.

Метод 3. Этот метод применяют для жиров различных типов [12]. Готовят жир нужного типа, окрашенный нильским голубым серноокислым (разд. 20.4.11). Добавляют 1 мл эмульсии растопленного жира к 20 мл агара, расплавленного и охлажденного до 45—50°C. Хорошо перемешивают, разливают по чашкам Петри и после затвердения агара делают посев штрихом. Положительная реакция: образование синего ореола вокруг колоний.

20.1.34. Лизиндекарбоксилаза

См. метод 1 для определения аргининдезимины (разд. 20.1.5). Вместо аргинина добавляют 1% дигидрохлорида L-лизина (или 2% DL-формы лизина).

Примеры: положительный результат — *Serratia marcescens*; отрицательный — *Proteus vulgaris*.

20.1.35. Потребление малоната

Пробирку с малонатным бульоном (разд. 20.3.21) инокулируют молодой жидкой культурой или культурой, снятой с агарового косяка. Инкубируют при 37°C в течение 48 ч. Положительная реакция: изменение зеленой окраски на густо-синюю.

Примеры: положительный результат — *Klebsiella pneumoniae*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.36. Разложение мяса анаэробами [7]

Инокулируют предварительно восстановленный бульон, содержащий рубленое мясо (разд. 20.3.10), и одновременно пропускают через пробирку очищенную от кислорода двуокись углерода. Инкубация длится 21 день. Положительный результат: разрушение частиц мяса с образованием рыхлой порошкообразной массы на дне пробирки.

Примеры: положительный результат — *Clostridium sporogenes*; отрицательный — *Clostridium butyricum*.

20.1.37. Тест с метиловым красным

Инокулируют пробирку с бульоном MRVP (разд. 20.3.24). Инкубация при 30 °С продолжается в течение 5 дней (в большинстве случаев достаточно 48-ч инкубации при 37 °С). Добавляют 5—6 капель раствора метилового красного (растворяют 0,1 г метилового красного в 300 мл 95%-ного этанола и разбавляют дистиллированной водой до 500 мл). Положительная реакция: появление ярко-красной окраски, свидетельствующей о том, что рН раствора $\leq 4,2$. Отрицательная реакция: желтая или оранжевая окраска. Слабая положительная реакция: красно-оранжевая окраска.

Примеры: положительная реакция — *Escherichia coli*; отрицательная — *Enterobacter aerogenes*.

20.1.38. Воздействие на молоко

Метод 1. Инокулируют пробирку с лакмусовым молоком (разд. 20.3.20). Реакции культур могут быть следующими. Подкисление: появление розовой окраски. Подщелачивание: появление синей окраски. Восстановление лакмуса: молоко становится белым за счет обесцвечивания лакмуса; обычно это происходит в нижней части пробирки. Кислый творожистый осадок: твердый розовый сгусток, который растворяется в щелочи и не сжимается. Творожистый осадок сычужного ти-

па: мягкий нерастворимый в щелочи сгусток, при сжатии которого отделяется сероватая сыворотка. Пептонизация (протеолиз): молоко становится полупрозрачным в результате гидролиза казеина, начинающегося чаще в верхней части столбика среды; кроме того, среда часто становится щелочной.

Метод 2 [7]. Этот метод применяют для анаэробов. Инокулируют предварительно восстановленную молочную среду (разд. 20.3.22), одновременно пропуская через пробирку двуокись углерода, очищенную от кислорода. Инкубация продолжается 3 нед. Проверяют наличие творожистого осадка и (или) пептонизации.

20.1.39. Подвижность

Готовят влажные препараты из молодых бульонных культур (т. е. находящихся в экспоненциальной фазе роста), выращенных при двух различных температурах (например, 37 и 20°C). В некоторых случаях на средах, содержащих глюкозу, подавляется образование жгутиков [15]. Методы исследования с помощью светового микроскопа описаны в разд. 3.3.4. Влажные препараты изучают сразу после приготовления. При исследовании анаэробов лучше всего рассматривать среднюю часть препарата, а при исследовании аэробов — области около воздушных пузырьков и у края препарата. Не все клетки должны быть подвижными. Для того чтобы штамм бактерий был признан подвижным, необходимо обнаружить хотя бы одну клетку, меняющую свое положение по отношению по меньшей мере к двум другим клеткам [12]. *Примечание:* подвижность следует отличать от броуновского движения (беспорядочного «покачивания» клеток) и от пассивного движения за счет потоков, образующихся под покровным стеклом.

Движения анаэробов можно также наблюдать в капиллярной трубке, если набрать в нее немного бульона и запаять сразу же оба конца капилляра в узком кислородном пламени [3]. Капилляр рассматривают с достаточно сильным объективом без иммерсии.

Некоторые бактерии, например принадлежащие к порядкам *Muxobacteriales* и *Cytophagales*, не имеют жгутиков, но обладают «скользящей подвижностью»

при контакте с твердой поверхностью. Методы обнаружения и наблюдения за «скользящей подвижностью» описаны в разд. 3.3.4.

20.1.40. Восстановление нитрата и денитрификация

Приготовление реактивов описано в разд. 20.4.12. Там же можно найти сведения об их канцерогенных свойствах.

Метод 1 [66]. Данный метод используют при количественном определении нитритов. Для этого инокулируют подходящую жидкую среду, содержащую 0,1% KNO_3 и 0,17% агара (последний добавляют для получения полужидкой консистенции и создания полуанаэробных условий). Инокулят смешивают со средой очень осторожно, равномерно распределяя его по пробирке. Во время инкубации периодически просматривают культуры для обнаружения пузырьков, что является предварительным указанием на денитрификацию. Контрольные культуры, выращенные без нитрата, не должны выделять газ и давать положительную реакцию на нитрит по методу, описанному ниже. Для определения способности микроорганизмов восстанавливать нитрат в нитрит берут по 0,1 мл культур различного возраста и добавляют к ним по 2 мл диагностического реактива (разд. 20.4.12). Затем добавляют воду до конечного объема 4 мл и оставляют на 15 мин для развития окраски. Интенсивность окраски измеряют визуально по пятибалльной шкале или с помощью спектрофотометра при 540 нм. Накопление нитрита с увеличением возраста культуры означает восстановление нитрата до нитрита, в то время как образование вначале нитрита с последующим снижением его уровня означает способность к дальнейшему восстановлению нитрита. Если красная окраска не появляется, добавляют до 5 мг цинковой пыли на каждый миллилитр смеси. Если нитрат в среде не восстановился, то добавление цинка приведет к его химическому восстановлению, о чем свидетельствует появление красной окраски. Отсутствие окраски означает, что организм восстановил весь нитрит и, по-види-

мому, произошла денитрификация. В этом случае положительную реакцию на нитрит можно получить при тестировании более молодой культуры. *Примечание:* цинковая пыль при длительном хранении может инактивироваться, поэтому следует периодически проверять ее способность восстанавливать нитрат в нитрит на неинкулированной пробе.

Примеры: реакция денитрификации — *Pseudomonas aeruginosa*; восстановление нитрата в нитрит — *Escherichia coli*; отрицательный результат — *Bacillus sphaericus*.

Метод 2. Этот метод используют для качественного определения нитрита. Бактерии выращивают так же, как в методе 1. Периодически проверяют наличие в культуре пузырьков газа, что является предварительным указанием на денитрификацию. К культурам различного возраста добавляют по 1 мл растворов А и Б (разд. 20.4.12). Розовая или красная окраска свидетельствует о присутствии нитрита. При отсутствии окраски наличие нитрата в культуре проверяют с помощью цинковой пыли, как описано в методе 1. Если не обнаруживается ни нитрит, ни нитрат, вероятно, произошла денитрификация. Контрольные опыты, описанные в методе 1, пригодны и для метода 2.

Другим способом доказательства образования газа является выращивание микроорганизма в нитратном бульоне (без агара) с маленьким перевернутым поплавком. При этом можно визуально наблюдать за накоплением газа во время денитрификации.

Метод 3 [66]. Этот метод позволяет обнаруживать оксид азота, образующийся при денитрификации, и обеспечивает более надежное доказательство наличия денитрификации, чем метод 1 или 2. Инокулируют пробирки или колбы с полужидкой нитратной средой. Закрывают сосуды пенициллиновыми пробками и шприцем через пробку вводят газообразный ацетилен, полученный, как описано в разд. 20.2.7, до конечной концентрации 1% (по объему). Ацетилен предотвращает дальнейшее восстановление оксида азота N_2O , образовавшегося в процессе денитрификации, до N_2 [18]. После того как культура вырастает, отбирают шприцем пробы газа и определяют присутствие N_2O методом газовой хро-

матографии на колонке 274 см×4,8 мм с порапаком Q (80—100 меш) при 35°C, используя детектор по термopроводности, а в качестве газа-носителя гелий.

20.1.41. Гидролиз нуклеиновых кислот

Метод 1. Этот метод используют для обнаружения как дезоксирибонуклеазы (ДНКазы), так и рибонуклеазы (РНКазы). ДНК и РНК (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) растворяют в дистиллированной воде в концентрации, достаточной для получения 0,2%-ного содержания в агаровой среде. ДНК легко растворяется в воде. Для растворения РНК в воду медленно добавляют 1 н. NaOH, следя за тем, чтобы pH не был выше 5,0. Раствор нуклеиновой кислоты добавляют в агаровую среду непосредственно перед автоклавированием (121°C, 15 мин) и разливают среду в чашки после охлаждения до 50°C. Делают посев культуры штрихом на твердой среде. После инкубации на поверхность агара наливают 1 н. HCl. Положительная реакция: появление вокруг участка роста чистой зоны, свидетельствующее о наличии ДНКазной или РНКазной активности.

Примеры: положительный результат (ДНКазы) — *Serratia marcescens*; отрицательный (ДНКазы) — *Enterobacter aerogenes*.

Метод 2. Этот метод используют только для теста на ДНКазу. Перед автоклавированием добавляют 100 мг толуйдинового синего O (Allied Chemical Corp., New York, N. Y.) на литр диагностической среды, содержащей ДНК (см. метод 1) [79]. В ином варианте добавляют раствор метилового зеленого (разд. 20.4.9) до конечной концентрации 0,005% [85]. На среде с толуйдиновым синим делают посев тест-организма штрихом через всю чашку, а на среде с метиловым зеленым культуру сеют истощающимся штрихом для получения отдельных колоний. Положительная реакция: появление ярко-розовой зоны вокруг участка роста на чашках с толуйдиновым синим и бесцветной зоны на зеленом фоне чашки с метиловым зеленым. Эти методы дают более удобную для наблюдения реакцию на ДНКазу, чем метод 1. *Примечание:* методы с использованием указанных красителей не следует применять для бактерий, выращи-

ваемых в анаэробных условиях, поскольку индикаторная система может не сработать [75].

Метод 3 [32]. Этот метод применяют в качестве более быстрого теста на ДНКазу, однако он не позволяет обнаруживать очень низкую ДНКазную активность [32]. Готовят диагностическую среду, содержащую 31,5 мг ДНК (Difco Laboratories), 5,0 мл 0,1 М CaCl_2 и 5,0 мл 0,1 М MgCl_2 в 100 мл трис-буфера, pH 7,4. Делают густую (молочного цвета) суспензию культуры в 0,5 мл этой среды и инкубируют 2 ч при 37°C. К 100 мл дистиллированной воды добавляют 1,6 мл раствора метилового зеленого (разд. 20.4.9), а затем смешивают 2 капли этого раствора с суспензией бактерий. После перемешивания смесь инкубируют еще 2 ч при 37°C. Положительная реакция: отсутствие окраски. Отрицательная реакция: сине-зеленая окраска.

20.1.42. O/129

На поверхность инокулированного агара в чашке Петри помещают 1—2 кристалла 2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридинфосфата (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). В другом варианте стерильные бумажные диски (диаметром 6—8 мм) импрегнируют раствором этого реактива (0,1 г в 100 мл ацетона), высушивают и помещают в чашки с инокулированной агаровой средой. Положительная реакция: вокруг кристаллов или дисков видна зона подавления роста.

Примеры: положительный результат — *Vibrio parahaemolyticus*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.43. Оптохин

Стерильный имеющийся в продаже (Difco Laboratories, BBL Microbiology Systems) оптохиновый диск для дифференциации микроорганизмов или стерильный бумажный диск, импрегнированный 0,02 мл 0,025%-ного раствора оптохина (гидрохлорида этилгидрокупреина; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), помещают на поверхность инокулированной агаровой среды в чашке Петри. Положительная реакция: вокруг диска видна зона подавления роста.

Примеры: положительный результат — *Streptococcus pneumoniae*; отрицательный — другие альфа-гемолитические стрептококки.

20.1.44. Орнитиндекарбоксилаза

См. метод 1 с использованием аргининдезимиказы (разд. 20.1.5). Вместо аргинина используют 1%-ный раствор дигидрохлорида L-орнитина (или 2%-ный раствор DL-формы).

Примеры: положительный результат — *Enterobacter aerogenes*; отрицательный — *Proteus vulgaris*.

20.1.45. Оксидаза

Метод 1. На отрезок фильтровальной бумаги наносят несколько капель 1%-ного раствора дигидрохлорида тетраметил-*n*-фенилендиамина (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), приготовленного в тот же день. Выросшую культуру снимают с поверхности агаровой среды платиновой петлей (обычные петли из нихромовой проволоки могут давать ложноположительную реакцию) и наносят ее на увлажненную бумагу. Положительная реакция: развитие фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 с.

Примеры: положительный результат — *Pseudomonas aeruginosa*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Метод 2. Этот метод менее чувствителен, чем метод 1, но он более удобен. Несколько капель смеси (1 : 1, по объему) 1%-ного α -нафтола, растворенного в 95%-ном этаноле, и свежеприготовленного 1%-ного водного раствора оксалата диметил-*n*-фенилендиамина (Difco Laboratories) наносят на колонии в чашках с агаром. В другом варианте к жидкой культуре добавляют 0,2 мл α -нафтола и 0,3 мл диметил-*n*-фенилендиамина и энергично перемешивают. Положительная реакция: окрашивание колоний или бульонной культуры в фиолетово-синий цвет в течение 10—30 с.

20.1.46. О/Ф-тест

Готовят основной раствор исследуемого углевода (обычно глюкозы), стерилизуют его путем фильтрования и добавляют с соблюдением правил асептики при 45—

50°C в автоклавированную полужидкую основную среду до конечной концентрации 0,5—1%. Чаще всего используют основную среду Хью и Лейфсона [44] (разд. 20.3.17). Если микроорганизмы не способны расти на этой среде из-за недостатка необходимых питательных веществ, добавляют дрожжевой экстракт (0,1%) или сыворотку крови (2%). Когда кислотообразование маскируется веществами щелочной природы, образующимися из пептона, можно использовать среду Борда и Холдинга [20] (разд. 20.3.8). Если рост тестируемого микроорганизма ингибируется содержащимся в среде бромтимоловым синим, следует заменить его такими индикаторами, как феноловый красный или бромкрезоловый пурпурный. Для морских бактерий целесообразно использовать модифицированную для теста О/Ф (MOF) среду Лейфсона [55] (разд. 20.3.19).

Для осуществления теста пробирки с полужидкой средой, содержащей углеводы, помещают на несколько минут в кипящую водяную баню для удаления большей части растворенного кислорода; затем их быстро охлаждают и столбики среды инокулируют с помощью прямой иглы. После инокуляции среду в одной из пробирок покрывают 10-мм слоем стерильного растопленного петролатума (это так называемая «анаэробная» пробирка). Среду во второй пробирке ничем не покрывают («аэробная» пробирка). Для выявления неспецифических реакций готовят контрольные пробы: 1) инокулируют такую же среду, не содержащую углеводов; 2) инкубируют стерильную среду с углеводом.

Результаты интерпретируют следующим образом. 1) Если кислота образуется только в аэробной пробирке, клетки катаболизируют углевод с использованием O_2 (реакция «О»). В этой пробирке рост должен быть заметным. 2) Если подкисление происходит и в аэробной, и в анаэробной пробирках, клетки способны также к брожению (реакция «F»). Рост должен быть замечен в обеих пробирках. 3) Если кислота не образуется ни в одной из пробирок, клетки не способны катаболизировать углевод. Если рост отсутствует, возможно, что в среде нет какого-либо питательного вещества, необходимого для роста изучаемого микроорганизма.

Примеры: реакция «F» с глюкозой — *Staphylococcus*

epidermidis; реакция «О» с глюкозой — *Micrococcus varians*; отрицательный результат с глюкозой — *Pseudomonas lemoignei*.

20.1.47. Фенилаланиндезаминаза

Густо засевают скошенный агар с фенилаланином (разд. 20.3.26). После инкубации наносят сверху на косяк 4—5 капель 10%-ного раствора хлорида железа(III). Положительная реакция: появление зеленой окраски, свидетельствующей об образовании фенилпирувата.

Примеры: положительный результат — *Proteus vulgaris*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.48. Фосфатаза

Метод 1. Этот метод используют для определения присутствия как кислой, так и щелочной фосфатазы. В агаровую ростовую среду, например питательный агар (разд. 20.3.25), расплавленный и охлажденный до 45—50 °С, добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество 1%-ного раствора натриевой соли дифосфата фенолфталеина (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), стерилизованного фильтрованием, до конечной концентрации 0,01%. Чашки с инокулированным штрихом агаром инкубируют от 2 до 5 дней. На крышку перевернутой чашки наносят 1 каплю раствора нашатырного спирта (удельный вес 0,880, концентрация 28—30%) и вставляют в них перевернутые чашки с культурой, для того чтобы пары аммиака достигли колоний. Положительная реакция: в результате образования свободного фенолфталеина колонии становятся красными.

Примеры: положительный результат — *Staphylococcus aureus*; отрицательный — *Micrococcus varians*.

Метод 2 [22]. Этот метод применяют для обнаружения только кислой фосфатазы. Готовят очень густую суспензию клеток в физиологическом растворе (0,85% NaCl). 0,3 мл суспензии добавляют к 0,3 мл раствора субстрата, содержащего 0,1 М цитратный буфер, pH 4,8, и 0,01 М динатрий-*n*-нитрофенилфосфат (Sigma Chemical Co.). Смесь инкубируют 6 ч при 37 °С. Затем

добавляют 0,3 мл 0,04 М глицинового буфера, рН которого доводят до 10,5 с помощью NaOH. Ставят также контрольные пробы без бактерий. Положительная реакция: появление желтой окраски, свидетельствующей об активности кислой фосфатазы.

Метод 3. Этот метод применяют для обнаружения только щелочной фосфатазы. Он совпадает с методом 2 с той лишь разницей, что *n*-нитрофенилфосфат растворяют не в цитратном, а в глициновом буфере. Для развития желтой окраски добавления глицинового буфера не требуется.

20.1.49. Присутствие поли-β-гидроксибутирата [53, 90]

Выращивают бульонную культуру микроорганизмов в условиях, способствующих образованию поли-β-гидроксибутирата (ПГБ). Для аэробных бактерий такими условиями являются лимитирование экспоненциального роста по азоту при избытке источников углерода и энергии, а также лимитирование по кислороду.

Предварительные доказательства присутствия ПГБ (разд. 3.3.11) можно получить в реакциях окрашивания, однако для точного определения требуется химический анализ.

Химический анализ. 1 мл культуры вносят в коническую стеклянную центрифужную пробирку, добавляют к нему 9 мл щелочного гипохлорита (разд. 20.4.19) и инкубируют 24 ч при комнатной температуре [90]. В другом варианте к 2 мл культуры добавляют 8 мл 5%-ного гипохлорита (имеющейся в продаже хлорной извести) и инкубируют [72]. Гипохлорит расщепляет большинство клеточных компонентов, но не расщепляет гранулы ПГБ. Смесь центрифугируют для сбора гранул, а прозрачную надосадочную жидкость удаляют. Осадок промывают, суспендируя его в 10 мл дистиллированной воды, центрифугируют и надосадочную жидкость удаляют. Еще раз промывают водой, затем дважды 10 мл ацетона и, наконец, дважды 10 мл диэтилового эфира. Осадок высушивают и добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Охлаждают ее содержимое до комнатной температуры и с помощью УФ-спектрофо-

тометра в кварцевых кюветах снимают спектр оптической плотности пробы по точкам от 215 до 255 нм через каждые 5 нм. В контрольную кювету вносят концентрированную серную кислоту. (Если оптическая плотность при 235 нм превышает 1,0, то пробу следует развести серной кислотой в соотношении 1:10 или выше.) Положительная реакция: наличие пика оптической плотности при 235 нм благодаря присутствию кротоновой кислоты, образующейся из ПГБ под действием серной кислоты.

Примеры: положительный результат — *Pseudomonas lemoignei*; отрицательный — *Pseudomonas aeruginosa*.

20.1.50. Гидролиз поли-β-гидроксибутирата [88]

Способность к гидролизу ПГБ является важным свойством с точки зрения дифференциации бактерий рода *Pseudomonas*; однако необходимой для анализа суспензии гранул ПГБ нет в продаже и приготовить ее довольно сложно. Подробности приготовления этой суспензии описаны в разд. 20.4.15.

Готовят агар без источника углерода, как описано в разд. 20.2.5, и разливают его в чашки. Ко второй порции среды, расплавленной и охлажденной до 45—50 °С, добавляют достаточное количество стерильной концентрированной суспензии гранул ПГБ до конечной концентрации в среде 0,25% (вес/объем). Агаризованную суспензию гранул наливают в чашки с затвердевшей средой для образования тонкого поверхностного слоя.

После того как поверхностный слой затвердеет, отмытую суспензию испытуемого микроорганизма засевают на небольшом участке агара в чашке. (В одной чашке можно испытывать несколько штаммов.) Инкубация продолжается несколько дней. Положительная реакция: рост бактерий на инокулированном участке и появление зон просветления за счет деполимеризации гранул ПГБ.

Примеры: положительный результат — *Pseudomonas lemoignei*; отрицательный — *Pseudomonas acidovorans*.

20.1.51. Пиоцианин и другие феназиновые пигменты

Инокулируют косяк со средой А (разд. 20.3.1) и затем просматривают его через 24, 48 и 72 ч. Положительная реакция: появление пигментов, диффундирующих в агар и окрашивающих его. В некоторых случаях пигменты могут лишь слабо растворяться в воде и осажаться в виде кристаллов в среде.

Примеры: пиоцианин — голубая окраска среды — *Pseudomonas aeruginosa*; феназин-1-карбоксильная кислота — желто-оранжевая окраска, возможна кристаллизация в колониях и окружающих колонии участках среды — *Pseudomonas aerofaciens*; оксихлорорафин — бледно-желтая окраска среды — *Pseudomonas chlororaphis*. Хлорорафин очень слабо растворим, он скапливается в виде отдельных зеленых кристаллов в участках роста на утолщенном конце косяка — *P. chlororaphis*.

20.1.52. Споры (эндоспоры)

Окрашивание спор описано в разд. 3.3.7. Среда для роста культур должны содержать достаточные количества ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} . Инокулируют среды с углеводами и без них и изучают культуры различных возрастов. *Примечание:* не следует ошибочно принимать за эндоспоры гранулы включений (например, ПГБ).

Когда обнаруживают спороподобные структуры, необходимо подтвердить наличие спор в опыте с нагреванием. Пробирку с бульоном инокулируют выросшей на твердой или жидкой среде культурой, в которой предполагают спорообразование. При этом стараются избежать контакта инокулята со стенками пробирки. Пробирку помещают в водяную баню при 80°C вместе с контрольной пробиркой, снабженной термометром, в которой содержится неинокулированный бульон. Необходимо убедиться в том, что уровень воды в бане выше уровня бульона. Инкубируют 10 мин начиная с того момента, когда температура достигнет 80°C . Пробирку охлаждают, инкубируют при оптимальной температуре и определяют наличие роста. *Примечание:* некоторые эндоспоры, например у определенных штаммов *Clostridium*

botulinum, при 80 °С могут погибнуть; в этом случае при определении устойчивости спор к нагреванию используют более низкие температуры (например, 75 или 70 °С). Для подтверждения спорообразования применяют также «поппинг-тест» (разд. 3.3.7). Некоторые виды *Nocardia* образуют «хламидоспоры», или «микроцисты», которые могут выдерживать температуру 80 °С в течение нескольких часов и все же не являются истинными эндоспорами.

20.1.53. Гидролиз крахмала

Готовят агаровую среду, на которой культура способна хорошо расти, добавляют 0,2% растворимого крахмала и кипятят. Среда не должна содержать глюкозы, так как в ее присутствии гидролиз крахмала может ингибироваться [93]. Среду стерилизуют при 115 °С в течение 10 мин и делают посев одним штрихом через центр чашки с крахмальным агаром. После инкубации агар заливают раствором иода (можно использовать иод, применяемый для окраски по Граму). Положительный тест: появление бесцветного участка вокруг зоны роста.

Примеры: положительный результат — *Bacillus subtilis*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.54. Диагностические тесты с использованием агаровой среды, содержащей три сахара и железо

Скошенный агар, содержащий три сахара и железо (разд. 20.3.34), инокулируют прямой иглой. Вначале засевают уколом до дна пробирки утолщенный конец косяка, а затем иглу извлекают и наносят штрихи на поверхность агара. Пробирку закрывают ватной пробкой или чем-то подобным, чтобы обеспечить доступ воздуха к среде. Чашки просматривают после инкубации при 37 °С в течение 18—24 ч. При этом можно получить три типа данных:

1. Брожение сахаров

Кислая реакция среды в утолщенной части агара (желтая окраска) и щелочная в скошенной (красная ок-

раска) свидетельствуют о сбраживании глюкозы, но не сахарозы или лактозы.

Кислая реакция в утолщенной части агара и кислая реакция в скошенной (равномерно желтый косяк) свидетельствуют о сбраживании лактозы и (или) сахарозы.

Щелочная реакция среды в утолщенной части агара и щелочная реакция в скошенной (равномерно красный косяк) свидетельствуют об отсутствии сбраживания.

2. Образование газа

Об образовании газа свидетельствуют пузырьки в утолщенной части косяка. Большое количество газа может разорвать агар или выбросить его вверх.

3. Образование сероводорода

Об образовании сероводорода свидетельствует почернение утолщенной части косяка в результате реакции H_2S с сульфатом железа (II)-аммония, продуктом которой является сульфид железа.

20.1.55. Уреаза

Метод 1. Инокулируют скошенный агар Кристенсена с мочевиной (разд. 20.3.12) и инкубируют. Положительный результат: появление красно-фиолетовой окраски.

Примеры: положительный результат — *Proteus vulgaris*; отрицательный — *Escherichia coli*.

Метод 2 [47]. Этот метод используется для микроорганизмов, не растущих на агаре Кристенсена с мочевиной. Готовят раствор, содержащий: 0,1065% БЭС-буфера [N,N-бис-(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота; ICN Pharmaceuticals, Cleveland, Ohio], 2,0% мочевины и 0,001% фенолового красного, pH 7,0. Стерилизуют фильтрованием и разливают с соблюдением правил асептики по 2,0 мл в небольшие пробирки. Бульонную культуру центрифугируют и к клеткам добавляют стерильную дистиллированную воду или физиологический раствор для получения густой суспензии. В пробирку со средой, содержащей мочевины, добавляют 0,5 мл клеточной суспензии. Инокулируют также контрольную среду без мочевины. Пробирки инкубируют 24 ч. Положительный тест: появление красно-фиолетовой окраски.

20.1.56. Реакция Фогес — Проскауера

Инокулируют две пробирки с бульоном MRVP (разд. 20.3.24). Одну пробирку инкубируют при 37° С, а другую — при 25° С. Через 48 ч 1 мл культуры переносят в другую пробирку, добавляют 0,6 мл 5%-ного (вес/объем) α-нафтола, растворенного в абсолютном этаноле, и тщательно перемешивают. Затем добавляют 0,2 мл 40%-ного водного раствора КОН. Вновь хорошо перемешивают и инкубируют, установив пробирку наклонно для увеличения площади поверхности среды (реакция зависит от доступа кислорода). Пробирку просматривают через 15 и 60 мин. Положительный тест: окрашивание поверхности среды в интенсивный красный цвет.

Примеры: положительный результат — *Enterobacter aerogenes*; отрицательный — *Escherichia coli*.

20.1.57. Потребности в факторах X и V

Чашки с агаром, содержащим соево-казеиновый гидролизат (разд. 20.3.31), инокулируют следующим образом. Стерильный ватный тампон смачивают в суспензии, отжимают на стенке пробирки для удаления лишней жидкости и проводят им по всей поверхности чашки (не повреждая агара). Используют стерильные бумажные полоски, пропитанные X-фактором (гемом) или V-фактором (NAD, DPN), которые можно приобрести у Difco Laboratories, Detroit, Mich. или BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md. Полоску с X-фактором помещают предварительно прокаленным в пламени пинцетом на поверхность инокулированного агара. На расстоянии 2 см от нее помещают полоску с V-фактором. Чашки инкубируют 1—2 дня. Результаты интерпретируют следующим образом. Наличие роста только вокруг одной полоски (с X- или V-фактором) означает потребность в соответствующем факторе. Наличие роста только на участке между двумя полосками означает потребность в обоих факторах. Наличие роста на всей поверхности чашки означает, что микроорганизм не нуждается ни в одном из факторов.

Примеры: положительная реакция и на X-, и на V-фактор — *Haemophilus haemolyticus*; положительная

реакция только на V-фактор — *Haemophilus parainfluenzae*; отрицательная реакция и на X-, и на V-фактор — *Escherichia coli*.

20.2. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ

20.2.1. Определение метаболитов методом газовой хроматографии ([7]; см. также разд. 16.3.4)

Кислоты и спирты

Методики, описанные ниже, были разработаны для идентификации анаэробов, но их можно также использовать для аэробов и факультативно анаэробных микроорганизмов. 1 мл культуральной среды, содержащей глюкозу или другие сбраживаемые углеводы, помещают в пробирку размером 12×75 мм и подкисляют 0,2 мл 50%-ной (по объему) H_2SO_4 ; подкисленные образцы можно хранить для последующего анализа. Добавляют 0,4 г NaCl и 1 мл диэтилового эфира. Пробирку закрывают корковой пробкой и ее содержимое перемешивают, осторожно переворачивая пробирку около 20 раз для перехода свободных жирных кислот в эфирную фазу. Смесь центрифугируют несколько минут и отделяют верхний слой эфира от слоя воды. Не следует удалять слишком много эфира, чтобы вместе с ним не попала вода. Эфирный слой помещают в другую пробирку размером 12×75 мм и добавляют безводный $CaCl_2$ (4—20 меш) в количестве, равном примерно $\frac{1}{4}$ объема эфира, для удаления растворенной воды. Отбирают 14 мкл и вводят в газовый хроматограф для анализа короткоцепочечных летучих жирных кислот и спиртов. Неинкулированную среду подкисляют, экстрагируют и используют в качестве контроля.

Пировиноградная, молочная, фумаровая и янтарная кислоты нелетучи, и поэтому для анализа методом газовой хроматографии их следует перевести в метиловые эфиры. 1 мл культуры помещают в пробирку размером 12×75 мм и добавляют 2 мл метанола и 0,4 мл 50%-ной H_2SO_4 . Вместо метанола можно добавить 2 мл метанольного раствора трехфтористого бора (BF_3), который

продается любой торговой организацией, поставляющей реактивы для хроматографии. Смесь нагревают 30 мин при 60°C. В пробирку добавляют 1 мл воды и 0,5 мл хлороформа, плотно закрывают и осторожно переворачивают пробирку приблизительно 20 раз. Удаляют слой хлороформа (нижний слой) и вводят 14 мкл в газовый хроматограф.

Рекомендуется использовать газовый хроматограф с детектором по теплопроводности (ТП). Можно использовать пламенно-ионизационный детектор (ПИД), однако при этом нельзя обнаружить муравьиную кислоту. Применяют колонку из нержавеющей стали, алюминия или стекла длиной 1,8 м и внутренним диаметром 6 мм. Колонку заполняют сорбентом Supelco SP-1000, 100—200 меш (Supelco Inc., Bellefonte, Pa.) или 5%-ным FFAP на хромосорбе G. И летучие жирные кислоты, и их метиловые эфиры анализируют на одной и той же колонке. Температура термостата колонок 135—145°C. В качестве газа-носителя используют гелий, скорость потока которого равна 120 см³/мин. Если прибор снабжен отдельными нагревателями для дозатора и детектора, их температуру устанавливают на 20—30°C выше температуры колонки. Используют самописец на 1 мВ со скоростью движения бумаги 1,3 см/мин. Готовят стандарты для летучих кислот, спиртов и нелетучих кислот (разд. 20.4.18) и экстрагируют их так же, как пробы с культурой. Такие стандарты можно приобрести у любой торговой организации, поставляющей реактивы для хроматографии.

О наличии или отсутствии, а также о приблизительных количествах различных конечных продуктов метаболизма судят по профилю, который можно использовать для идентификации бактерий. Дополнительные количественные данные можно получить методом абсолютной калибровки, используя стандартные калибровочные кривые для каждой кислоты или спирта. Порядок элюирования спиртов и летучих жирных кислот из газохроматографической колонки таков: этанол, *n*-пропанол, изобутанол, *n*-бутанол, изоамиловый спирт, *n*-пентанол, уксусная, муравьиная, пропионовая, изомасляная, *n*-масляная, изовалериановая, *n*-валериановая, изокапроновая, *n*-капроновая и гептановая кислоты.

Метилловые эфиры нелетучих кислот элюируются в следующем порядке: эфир пировиноградной, молочной, щавелево-уксусной, щавелевой, метилмалоновой, малоновой, фумаровой и янтарной кислот.

Водород и метан

Образование водорода и метана определяют в культурах, выращенных в среде, содержащей глюкозу или другие сбраживаемые углеводы.

Пробирки с культурами закрывают резиновыми пробками и инкубируют. После того как культуры вырастут, из пространства над культуральной средой отбирают пробы газа, вводя иглу шприца через резиновые пробки. Для этого пользуются 1- или 5-мл пластмассовым шприцем одноразового пользования с иглой длиной 3,8 см. Иглу вводят между резиновой пробкой и стенкой пробирки, а если понадобится, и через пробку под углом, позволяющим ей войти в газовую фазу над культуральной средой. Отбирают 0,7—1,0 мл газовой фазы и вводят в газовый хроматограф.

Газовый хроматограф должен быть оснащен детектором по теплопроводности. В качестве газа-носителя используют азот или аргон со скоростью потока 25—30 см³/мин. Колонку из алюминия или нержавеющей стали длиной 1,83 м и диаметром 0,64 см заполняют силикагелем (N 12, 80—100 меш; Supelco Inc., Bellefonte, Pa.). Температура термостата колонки 25—30 °C; если прибор оснащен отдельными термостатами дозатора и детектора, их устанавливают на ту же температуру, что и термостат колонки, или на несколько градусов выше. Стандарты для анализа газа продаются любой фирмой, поставляющей материалы для хроматографии. Для определения точки элюирования метана используют природный газ. В случае смеси водорода и метана водород элюируется из колонки раньше, чем метан.

20.2.2. Оптическое вращение молочной кислоты [7, 24]

К 10 мл культуры и 10 мл неинкубированной среды добавляют 0,2 мл 50%-ной (по объему) H₂SO₄. Концентрацию молочной кислоты определяют (в миллиэквива-

лентах на 100 мл) методом газовой хроматографии и используют для этого 1 мл подкисленной культуры (разд. 20.2.1). Для определения оптического вращения по описанному ниже методу минимальная концентрация молочной кислоты должна быть 1 мэкв/100 мл.

Приготовление растворов хлорной кислоты, буфера, лактатдегидрогеназы и NAD описано в разд. 20.4.8.

L-(+)-Молочную кислоту и рабочий стандарт готовят следующим образом. К 5,0 мл подкисленной неинкубированной среды добавляют 0,0296 г L-(+)-молочной кислоты (кальциевой соли) и 5,0 мл дистиллированной воды. 1,0 мл этого раствора добавляют к 1,0 мл хлорной кислоты. Центрифугируют и собирают надосадочную жидкость, которая является рабочим стандартом (1,0 мкмоль L-(+)-молочной кислоты в 0,1 мл).

К 1,0 мл подкисленной культуры добавляют 1,0 мл дистиллированной воды и 2,0 мл хлорной кислоты. Центрифугируют и отделяют надосадочную жидкость, которая служит образцом при определении оптического вращения.

К 1,0 мл подкисленной неинкубированной среды добавляют 1,0 мл дистиллированной воды и 2,0 мл хлорной кислоты. Смесь центрифугируют и отделяют надосадочную жидкость, которая является основным контрольным раствором.

Берут 7 стеклянных пробирок 12×75 мм. В пробирку 1 вносят 0,1 мл основного контрольного раствора. В пробирки 2—6 вносят соответственно 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 и 0,10 мл рабочего стандарта молочной кислоты. Добавляют в каждую пробирку соответственно 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 и 0,00 мл основного контрольного раствора и доводят объем жидкости до 0,10 мл. В пробирку 7 вносят 0,10 мл испытуемого образца. В каждую из семи пробирок добавляют последовательно по 3,0 мл буфера и 0,03 мл раствора лактатдегидрогеназы. Затем добавляют 0,1 мл раствора NAD, закрывают каждую пробирку парафильмом и осторожно переворачивают несколько раз для перемешивания растворов (пробирки не встряхивать). Инкубируют при 30°C в течение 60 мин, точно выдерживая время с момента добавления NAD в 1-ю пробирку.

В каждой пробирке измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 340 нм. Если на используемом приборе нельзя снимать показания при этой длине волны, измеряют при длине волны, близкой к 340 нм, например в случае спектрофотометра Spectronic 20 (Bausch and Lomb, Inc., Rochester, N. Y.) устанавливают длину волны 366 нм. Пробирку 1 используют в качестве контроля при установке прибора на нуль. Снимают показания величины оптической плотности, точно соблюдая ту же последовательность, в которой добавляли NAD. Для снятия показаний пользуются одной и той же кюветой; после измерения содержимое кюветы выливают, кювету споласкивают и заполняют следующим раствором.

На миллиметровой бумаге строят график зависимости оптической плотности от количества L-(+)-молочной кислоты (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мкмоль соответственно в пробирках 1—6). Калибровочную кривую проводят с максимальной точностью. На основе этой стандартной кривой определяют количество L-(+)-молочной кислоты в микромолях в испытуемой пробе (пробирка 7). Эту величину умножают на 4 и получают количество L-(+)-молочной кислоты в миллиэквивалентах на 100 мл культуры. Вычисляют процент L-(+)-молочной кислоты по формуле:

$$\frac{\text{мэкв L-(+)-молочной кислоты (результат ферментативной реакции)}}{\text{мэкв молочной кислоты (общее содержание, определенное с помощью газовой хроматографии) в 100 мл}} \cdot 100.$$

20.2.3. Системы комбинированного тестирования

В продаже имеется несколько удобных систем для быстрой идентификации различных групп бактерий, особенно сем. Enterobacteriaceae. Полную информацию по идентификации с помощью таких систем можно получить от фирм-изготовителей. Там же можно получить бланки для фиксирования результатов: таблицы, системы кодирования или характеристичные профили, разработанные для этих систем. Ниже дано краткое описание некоторых систем, а также ссылки на литературу,

из которой можно составить представление об их точности и надежности.

Система API 20E для идентификации Enterobacteriaceae и несбраживающих бактерий (Analytab Products, Plainview, NY 11803) состоит из пластмассовой пластинки с 20 вставленными в нее микропробирками, содержащими (в сухом виде) различные среды, с помощью которых можно провести 23 биохимических теста в течение 18—24 ч. Среда становятся пригодными для использования при добавлении в микропробирки разбавленной суспензии испытуемых микроорганизмов. Суспензию предохраняют от высыхания, добавляя воду в углубления в пластмассовой пластинке, в которую помещают пробирки. В некоторые микропробирки добавляют стерильное вазелиновое масло для предотвращения доступа кислорода. Оценка надежности системы дается в работах [16, 31, 40, 68—70, 76, 78, 81].

Система API 20A для анаэробов (Analytab Products) похожа на систему API 20E. Колонии бактерий суспендируют в среде для анаэробов и суспензию используют для разведения сухих сред в микропробирках в аэробных условиях. Затем пластинку с микропробирками помещают в анаэроостат или анаэробный бокс и инкубируют от 24 до 48 ч при 35—37 °C [62].

Система Entero-Set 20 для идентификации Enterobacteriaceae (Fischer Scientific Co., Diagnostics Div., Orangeburg, NY 10962) похожа на систему API. Их отличие состоит в том, что при заполнении микропробирок первой системы бактериальной суспензией из них удаляется воздух. В некоторые пробирки добавляют масло, чтобы предотвратить доступ кислорода к среде.

Система Minitек для Enterobacteriaceae, несбраживающих бактерий, Neisseria и анаэробов (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md 21030) состоит из пластмассовой пластинки с 12 лунками. С помощью специального устройства в лунки помещают диски, импрегнированные субстратами. Набор дисков подбирают фирма-изготовитель или те, кто ими пользуется. С помощью автоматической пипетки со стерильным накопчиком одноразового пользования в каждую лунку помещают суспензию испытуемой бактерии в бульоне Minitек. Некоторые лунки покрывают слоем масла. Вре-

мя инкубации для представителей сем. *Enterobacteriaceae* составляет от 18 до 24 ч, для несбраживающих бактерий — от 24 до 48 ч и для *Neisseria* — 4 ч. Испарение в процессе инкубации предотвращают с помощью пластмассового увлажнителя. В случае анаэробных организмов суспензию клеток в бульоне для анаэробов разливают в лунки с дисками и инкубируют в анаэроостате или анаэробном боксе в течение 48 ч [17, 40, 41, 49, 89].

Система PathoTec Rapid I-D для идентификации *Enterobacteriaceae* и других групп (General Diagnostics Div., Warner-Lambert Co., Morris Plains, NJ 07950) состоит из 10 полосок, пропитанных реактивами для тестов на фенилаланиндезаминазу, лизиндекарбоксилазу, утилизацию малоната и т. д. Полоски помещают в пробирки с суспензией испытуемых микроорганизмов; в некоторых случаях ими проводят по колониям клеток. Результат определяют приблизительно через 4 ч, за исключением теста на оксидазу, когда результат получают через 30 с [40, 68, 69].

Система Enterotube для идентификации представителей сем. *Enterobacteriaceae* (Roche Diagnostics, Nutley, NJ 07110) состоит из пробирки с 8 отсеками, заполненными различными агаровыми средами. Через отсеки проходит канал с тонким металлическим стержнем. Выступающим концом стержня касаются колонии и затем протягивают его через все отсеки, засеивая таким образом различные среды. Некоторые среды для защиты от воздуха покрывают слоем воска. Результаты учитывают после инкубации в течение 24 ч [39, 63, 68, 69, 92].

Система Oxi/Ferm для идентификации несбраживающих грамотрицательных палочек (Roche Diagnostics) похожа на систему Enterotube, но предназначена для несбраживающих организмов [31, 48, 71, 80].

Система Corning r/b Enteric Differential для идентификации представителей сем. *Enterobacteriaceae* (Corning Medical Microbiology Products, Roslyn, NY 11576) состоит из двух пробирок обычного размера с сужениями посередине, разделяющими их на 2 отсека. В пробирках находятся агаровые среды. Система позволяет определять 9 различных свойств, две дополнительные пробирки со средами позволяют осуществлять при не-

обходимости еще 6 тестов. В агар вводят до дна иглу с бактериями (через сужение), а затем вынимают ее и инокулируют штрихом скошенную поверхность агара. Результаты определяют через 18—24 ч [59, 78, 86].

Система Corning N/F для идентификации окисляющих грамотрицательных бактерий (Corning Medical Microbiology Products), состоящая из двух пробирок со средами (пробирки GNF и 42P), позволяет проводить первую оценку по результатам 5 реакций через 18—24 ч. Последующие тесты осуществляют в круглых пластмассовых чашках (чашки Uni-N/F-Tek) с углублениями, заполненными различными агаровыми средами. В них можно провести 12 дополнительных реакций, результаты которых регистрируют через 24—48 ч. Среда в лунках инокулируют каплей бактериальной суспензии.

Система Micro-ID для идентификации бактерий сем. Enterobacteriaceae (General Diagnostics Div., Warner-Lambert Co.) представляет собой пластинку с 15 тест-камерами, содержащими диски фильтровальной бумаги, пропитанной реактивами и субстратами. Содержимое камер инокулируют суспензией бактерий. Нанесение сверху слоя масла для защиты от кислорода не требуется. Результаты учитывают после инкубации при 37 °C в течение 4 ч [16].

20.2.4. Многоточечные инокуляторы

Широкое распространение имеющих в продаже стерильных пластмассовых чашек для микротитрования (пластмассовых чашек с 96 миниатюрными лунками, каждая объемом около 0,2 мл) привело к развитию микрометодов, позволяющих определять образование кислот из углеводов, образование газов и другие биохимические реакции.

Многоточечный инокулятор можно изготовить самостоятельно, вставив острыми концами булавок из нержавеющей стали с 27-мм головками в заполненные воском лунки или чашку для микротитрования [36]. Можно также вколоть булавки или штифты в деревянную, пластмассовую или металлическую основу в точном соответствии с лунками в чашке для микротитрования [37]. Металлический инокулятор обладает тем

преимуществом, что его можно автоклавировать, однако другие инокуляторы можно с успехом «стерилизовать», опуская булабочные головки в спирт и затем выдерживая их 1—2 с в пламени головками вверх [36]. Чтобы «зарядить» инокулятор, его приводят в контакт с клетками, опуская на шаблонную пластинку для микротитрования, каждая лунка которой содержит отдельный штамм бактерий; при этом на каждой булабочной головке остается около 0,006 мл культуры. Затем инокулятор приводят в контакт с пластинкой для микротитрования, лунки которой заполнены бульоном с углеводом. При этом каждая лунка с бульоном инокулируется определенным штаммом бактерий, находящимся на отдельной булабочной головке. Инокулятор вновь опускают на шаблонную пластинку для «перезарядки» и инокулируют вторую пластинку для микротитрования, лунки которой заполнены средами с другим углеводом и т. д. Для определения образования газа из углеводов каждую инокулированную лунку покрывают стерильной смесью, содержащей 1 часть амоджела (American Oil Co.) и 1 часть вазелинового масла [38]. Инокулированные чашки закрывают крышками и инкубируют. Образование кислоты определяют по изменению цвета рН-индикатора, помещенного в среду. Накопление пузырьков под верхним слоем масла свидетельствует о газообразовании.

Заполнение лунок чашки для микротитрования стерильной средой можно значительно облегчить, пользуясь многоканальной автоматической пипеткой (Cooke Engineering Co., Alexandria, Va.) или другим подобным устройством. Можно самостоятельно изготовить приспособление, описанное, например, Уилкинсом и др. [96]. Для этого берут иглы № 18 для подкожных инъекций, снимают с них наконечники и вынимают мандрены. Затем иглы припаивают медно-цинковым припоем к отверстиям на трубке из нержавеющей стали длиной 13,5 см и диаметром 7 мм так, чтобы расстояния между иглами были равны расстояниям между лунками пластинки для микротитрования (рис. 20.2). Один конец трубки оставляют открытым, а к другому концу припаивают медно-цинковым припоем соединитель типа Люер-Лок. После стерилизации всего устройства этот

соединитель прикрепляют с соблюдением правил асептики к стерильному автоматическому пипеточному шприцу типа Корнуолл (Becton, Dickinson and Co., Rutherford, N. J.), снабженному стерильным шлангом для заполнения (рис. 20.2). Конец шланга погружают в колбу со стерильной средой и заполняют шприц, несколько раз оттягивая поршень. Затем восьмигольчатую гребенку,

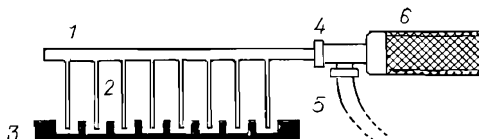


Рис. 20.2. Устройство для одновременного заполнения восьми лунок пластинки для микротитрования. 1 — трубка из нержавеющей стали; 2 — иглы для подкожных инъекций № 18, припаянные к трубке; 3 — пластина для микротитрования с лунками; 4 — соединитель типа Люер-Лок, припаянный к концу трубки; 5 — заполняющая трубка, присоединенная к шприцу типа Корнуолл; 6 — цилиндр и поршень шприца. Нажимая на поршень, одновременно заполняют стерильной средой 8 лунок.

приготовленную таким образом, устанавливают над рядом из восьми лунок на пластинке для микротитрования и надавливают на поршень шприца, вливая одновременно по 0,2 мл среды в каждое углубление. Таким же способом заполняют все остальные ряды лунок на пластинке. Устройство промывают стерильной водой (или кипятком, если в лунки вносят агаровую среду) и затем заполняют другой средой, которую предстоит внести в лунки.

С помощью пластинок для микротитрования можно проводить и другие биохимические тесты. Например, тест на индол проводят, добавляя 2 капли реактива Ковача в культуры, находящиеся в лунках, а для проведения реакции Фогес — Проскауера в культуру добавляют 1 петлю α -нафтола и затем 1 петлю КОН [37]. Однако некоторые тесты нельзя проводить с помощью пластинок для микротитрования. Например, при определении уреазы аммиак, образуемый уреазоположительными микроорганизмами, может диффундировать в соседние лунки и давать ложноположительный результат.

Для засева поверхности диагностического агара в обычных чашках Петри можно применять многоточечные инокуляторы [36, 57]. С помощью таких инокуляторов с заостренными штифтами или булавками можно в случае необходимости инокулировать бактерии прокалыванием агара [65]. Однако при посеве различных штаммов в одной чашке может происходить чрезмерное разрастание или взаимное перекрывание колоний. Эта проблема исчезает при использовании чашек Петри, разделенных на отсеки (Dynos Plastics Ltd., Surbiton, Surrey England) [57], миниатюрных формочек для получения кубиков льда [36] или пластинок для микротитрования [37, 96]. На последних можно приготовить маленькие косячки, например косячки агаровой среды с тремя сахарами и железом, и инокулировать их с помощью прокалывающего инокулятора [37].

При многоточечной инокуляции анаэробов в лунки пластинок для микротитрования разливают стерильные полужидкие среды и инкубируют их с закрытыми крышками в течение ночи при 37 °С для выявления посторонних бактерий, а также для подсушивания [95]. Пластины помещают в анаэробный бокс с перчатками и оставляют на 2 дня для восстановления сред перед инокуляцией. Пластины инокулируют с помощью прокалывающего инокулятора внутри бокса с перчатками. Хотя каждая пластинка имеет 96 лунок, инокулируют только 48 из них (в шахматном порядке), а 48 оставляют неинокулированными в качестве контрольных лунок для обнаружения изменений рН небактериального характера или возможной миграции подвижных бактерий из одной лунки в другую. После инокуляции каждую пластинку закрывают полоской стерильной нетоксичной пластмассовой ленты (Cooke Engineering Co.). Сначала ленту кладут на резиновую подставку липкой стороной вверх, а затем прижимают к ней перевернутую пластинку. Для того чтобы каждая лунка была плотно закрыта, по пластинке проводят роликом. Для выхода газов во время роста над каждой лункой делают отверстие с помощью ленточного перфоратора. Пластины инкубируют в течение 3 дней в анаэробном боксе. Кислообразование определяют с помощью тонкого рН-электрода (такого, например, как электрод S-30070-10, Sargent-Welch

Co., Skokie, Ill.), который вводят в среду в каждую лунку. Можно не промывать электрод после каждой лунки, так как при каждом погружении остатки агара на кончике электрода перемещаются вверх [95].

20.2.5. Множественная инокуляция с помощью бархата

Метод множественной инокуляции с помощью бархата предназначен для определения потребностей в питании большого числа штаммов. Ниже описана методика, с помощью которой можно определить способность 267 штаммов псевдомонад к использованию 146 различных органических соединений в качестве источников углерода и энергии [88].

Готовят агаровую среду следующего состава: 40 мл буфера $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ (1,0 М, рН 6,8); 20 мл безвитаминной минеральной основной среды Хатнера (разд. 20.3.18); 1,0 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 20 г агара и 940 мл дистиллированной воды. В среду добавляют 0,1—0,2% испытуемого источника углерода и разливают ее по чашкам Петри. Агар в стерильных чашках подсушивают инкубацией при 37 °С в течение 2—3 дней. Чашки хранят до применения (не больше 4—5 нед) в пластмассовых пакетах при комнатной температуре. Матричную чашку готовят, высевая на агаровую среду, содержащую 0,5% дрожжевого экстракта, методом «заплаток» (инокулируют лишь небольшие участки) до 23 различных штаммов бактерий. После того как появляются колонии, с помощью бархата методом отпечатков, впервые описанным Ледербергами [54], засевают вспомогательные чашки. См. также разд. 13.6.2. Согласно этому методу, кусочек стерильного бархата прикрепляют к цилиндрической болванке с диаметром, немного меньшим диаметра чашки Петри, и осторожно прижимают его ворсинками к агару в матричной чашке. Затем таким же образом прижимают его к стерильному агару в других чашках. В результате перепечатывания колонии во вспомогательных чашках имеют точно такое же расположение, как и в матричной. От одной матричной чашки можно инокулировать 9 вспомогательных чашек. После появления признаков роста культур во вспомога-

тельных чашках каждую из них используют для посева методом отпечатков в 9 других чашек с различными соединениями углерода, а затем в последнюю чашку с агаром, содержащим дрожжевой экстракт, для того чтобы проверить, имел ли место перенос всех штаммов. Чашки просматривают через 48 и 96 ч и результаты учитывают следующим образом: рост не лучше чем на контрольной чашке без источника углерода 0; хороший рост +; рост недостаточно хороший, однако существенно лучший чем на контрольной чашке $\pm$; запоздалый рост нескольких колоний на месте мазка, которые предположительно возникли из мутантов, содержавшихся в инокуляте +М. Когда штаммы с сильно различающимися потребностями в питательных веществах высевают на одну чашку, может происходить перекрестное питание (за счет диффузии питательных веществ, продуцируемых одним штаммом, к примыкающим колониям других штаммов, что приводит к ложноположительной реакции) или один штамм может мешать росту другого. Поэтому после первоначального производного скрининга проводят второй скрининг, используя иное расположение колоний штаммов в матричной чашке.

20.2.6. Ауксанографический метод определения потребностей в питательных веществах

Расплавленную основную агаровую среду (при температуре 45—50°С) без источников углерода инокулируют отмытой суспензией испытуемого микроорганизма. Погружают края стерильных дисков из фильтровальной бумаги в стерильные растворы различных соединений углерода, позволяя жидкости импрегнировать диск. Эти диски можно сразу же положить на поверхность инокулированного агара в чашках, или же их можно хранить до использования в высушенном состоянии в стерильном контейнере. Диски располагают по краю чашки Петри (3—4 диска на чашку) или на больших поверхностях инокулированного агара (например, разлитого в пирексовые противни) на соответствующем расстоянии друг от друга. После инкубации проверяют наличие зон роста (помутнения) вокруг диска, свидетельствующую

щих об использовании источника углерода. В некоторых случаях рост наблюдается только в виде линии между двумя дисками; это, по-видимому, означает, что организму требуются оба источника углерода. Рост по всей поверхности агара может быть вызван слишком густым посевом; в таком случае следует применять более разбавленный инокулят.

20.2.7. Нитрогеназная активность и азотфиксация (см. также разд. 17.6.10)

Метод, основанный на восстановлении ацетилена, позволил относительно легко по сравнению с методами включения $^{15}\text{N}_2$ определять нитрогеназную активность у бактерий, хотя методы включения $^{15}\text{N}_2$ по-прежнему остаются наиболее точными. Принцип метода восстановления ацетилена основан на способности нитрогеназного комплекса ферментов восстанавливать ацетилен до этилена. Испытуемый микроорганизм культивируют в условиях, способствующих образованию нитрогеназы. Затем в сосуд с культурой добавляют газообразный ацетилен и после инкубации определяют образование этилена. Контрольные культуры на средах, содержащих ионы аммония, которые подавляют синтез нитрогеназы (за исключением *Rhizobium*), образуют мало этилена или вообще не образуют его. Подробное описание метода восстановления ацетилена и его применения приводится в ряде работ [4, 5, 11].

Важно культивировать организмы в условиях, способствующих синтезу нитрогеназы. Это требует использования среды, не содержащей связанного азота, но содержащей нужный источник углерода и энергии, а также источник молибдена. Кроме того, необходимо обеспечить соответствующую газовую атмосферу. Для анаэробных организмов, таких, как *Clostridium pasteurianum*, необходимы анаэробные условия. Анаэробные условия благоприятны также для синтеза нитрогеназы у факультативных анаэробов, таких, как *Klebsiella*. Многие азотфиксаторы для роста и образования энергии нуждаются в кислороде, но устойчивость к кислороду для роста в условиях азотфиксации у таких организмов сильно различается. Например, *Azospirillum* луч-

ше всего растет в условиях азотфиксации при концентрации кислорода около 1% и не растет вообще на воздухе (21% кислорода), тогда как *Azotobacter* является аэротолерантным. Однако даже аэробные азотфиксаторы обычно лучше фиксируют азот при более низком уровне кислорода, чем в воздухе.

Аэробные азотфиксаторы

Микроорганизмы выращивают на (или в) солевой среде (твердой или жидкой) в пробирках, закрытых ватными пробками, или в пенициллиновых флаконах. Примером такой среды является среда Бёрка для *Azotobacter* (разд. 20.3.9). Иногда для инициации роста желательно добавлять небольшое количество источника связанного азота (например, 0,0001—0,005% дрожжевого экстракта). В конце инкубационного периода ватную пробку заменяют стерильной пенициллиновой пробкой. Газообразный ацетилен собирают (внимание: огнеопасно!) в вытяжном шкафу следующим образом [11]. В пробирку, наполовину заполненную 15 мл воды, добавляют кусочек (около 1 г) карбида кальция. Пробирку немедленно закрывают пробкой с отверстием, через которое она с помощью резиновой трубки соединяется с химическим стаканом с водой, куда погружен конец трубки. После того как ацетилен вытеснит воздух из трубки, но все еще продолжает образовываться, его отбирают из трубки шприцем с иглой для подкожных инъекций № 26. Ацетилен вводят в сосуд с культурой через резиновую пробку до концентрации 10% (по объему). Через различные промежутки времени инкубации отбирают шприцем пробы газа по 1 мл из сосуда с культурой и проверяют наличие этилена методом газовой хроматографии (см. ниже).

Факультативно анаэробные и анаэробные бактерии

Очищенный от кислорода и пропущенный через фильтр газообразный азот пропускают через стерильную культуральную среду, помещенную в пробирки, и одновременно инокулируют среду. Пробирки закрывают стерильными пенициллиновыми пробками. Для факультативно анаэробных бактерий, таких, как *Klebsiella*,

стро́го анаэробные условия не обязательны, так как клетки сами могут использовать небольшие остаточные количества кислорода и создавать высокоанаэробные условия. Примеры сред приведены в разд. 20.3.35 (для *Klebsiella*), 20.3.13 (для *Clostridium pasteurianum*) и 20.3.16 (для *Bacillus*).

Можно также использовать пробирки Панкхурста объемом 40 мл (Asteli Laboratory Service Co., Ltd., London S.E. 6, England) [23]. Пробирка Панкхурста (рис. 20.3) состоит из двух пробирок (одна из которых больше, а другая меньше по размеру) и горизонтальной соединительной трубки, заполненной несорбирующей ватой в качестве фильтра для газа. В большую пробирку наливают 5—10 мл культуральной среды и временно закрывают ватной пробкой. Среду стерилизуют автоклавированием. Охлажденную среду инокулируют и с соблюдением правил асептики закрывают обе пробирки стерилизованными пенициллиновыми пробками. Через систему пропускают газообразный азот (иногда в этой стадии нет необходимости; см. [11]), вставив в обе пробки иглы для подкожных инъекций, одну — для ввода газа, другую — для вывода. После пропускания газа иглы убирают и в меньшую пробирку вносят 0,75 мл насыщенного раствора пирогаллола, а затем 0,75 мл раствора, содержащего 10% (вес/объем) NaOH и 15% (вес/объем) K₂CO₃.

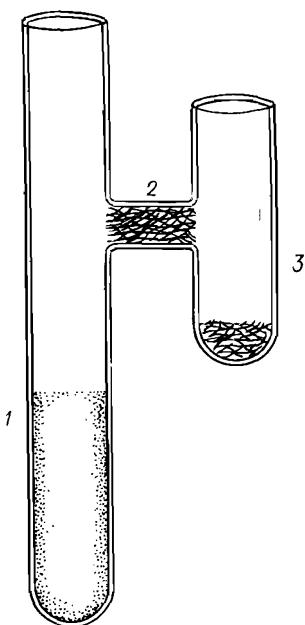


Рис. 20.3. Пробирка Панкхурста.

- 1 — большая пробирка (1,9×15,7 см) с культурой;
- 2 — соединительная трубка (0,8×1,8 см) с непоглощающей ватой в качестве фильтра для газа;
- 3 — меньшая пробирка (1,9×6,0 см) с гигроскопической ватой для щелочного пирогаллола.

Эти добавки впитываются небольшим кусочком сорбирующей ваты, заранее помещенной на дно меньшей пробирки, как показано на рис. 20.3. Добавленные химические вещества реагируют с остаточным кислородом и удаляют его, благодаря чему создаются анаэробные условия. Если не пропускать азот через пробирку Панкхурста, то для создания анаэробных условий требуется 2—3 ч, и в этот период для замещения удаленного кислорода следует добавить приблизительно 12 мл молекулярного азота [11].

После того как культура вырастет, через резиновую пробку вводят ацетилен до конечной концентрации 10% (по объему). Культуру инкубируют в течение различных периодов времени и шприцем отбирают пробы газа по 1 мл для газохроматографического обнаружения этилена.

Бактерии, нуждающиеся в микроаэробных условиях для азотфиксации

Полужидкие безазотные среды успешно используются для демонстрации восстановления ацетилена азотфиксирующими спиралями (см., например, разд. 20.3.3, где описана среда для *Azospirillum*). Полужидкие среды можно инкубировать на воздухе, так как они обеспечивают градиент концентрации кислорода, направленный от поверхности среды вниз. Это позволяет микроаэрофильным бактериям расти при любом наиболее подходящем для них уровне содержания кислорода. Рост начинается в виде узкой полосы или тонкой пленки в нескольких миллиметрах ниже уровня поверхности среды; по мере увеличения числа клеток пленка уплотняется и приближается к поверхности среды. Пробирку не следует встряхивать во время роста или последующего добавления ацетилена, так как при любом повреждении пленки может открыться доступ кислорода к клеткам и инактивироваться нитрогеназа.

После начала роста в пробирке или флаконе ватную пробку заменяют пенициллиновой и впрыскивают ацетилен до конечной концентрации 10% (по объему). После инкубации в течение различных периодов времени отбирают пробы газа до 1 мл для газохроматографического анализа (см. ниже).

*Газовая хроматография
(см. также разд. 16.3.4)*

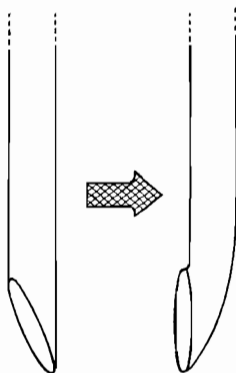
Используют газовый хроматограф с водородным пламенным детектором. Обычно длина колонки составляет 1,5 м, внутренний диаметр 2 мм. Колонку заполняют порпаком R или N (Waters Associates Inc., Framingham, Mass.). Температура термостата колонки равна $+50^{\circ}\text{C}$, причем ее можно поддерживать при любом постоянном значении в интервале от комнатной температуры до 80°C . В качестве газа-носителя используют азот со скоростью потока $\sim 50\text{ см}^3/\text{мин}$. Калибруют хроматограф имеющимся в продаже этиленом (степень чистоты 99%), разбавленным азотом.

Пробы газа и стандарты этилена вводят пластмассовым шприцем одноразового пользования. Поскольку на пластмассовой поверхности шприца остается небольшое количество этилена, после использования его выбрасывают и заменяют новым. Резиновые пенициллиновые пробки также могут загрязняться этиленом, их тоже нельзя использовать повторно.

На пенициллиновых пробках или резиновой прокладке дозатора газового хроматографа могут оставаться отверстия от игл. Во избежание этого кончик иглы загибают, как показано на рис. 20.4.

В процессе хроматографирования проб газа, содержащих и ацетилен, и этилен, ацетилен выходит из ко-

Рис. 20.4. Схематическое изображение кончика иглы шприца. Справа показано, как надо загнуть его, чтобы при прохождении иглы через пробки от пенициллиновых флаконов или резиновые перегородки в них не оставались дырки.



лонки с порпаком позже, чем этилен. Нельзя вводить в хроматограф новые пробы, пока ацетилен от предыдущей пробы не пройдет через колонку.

20.2.8. Серология

Тесты на агглютинацию на предметных стеклах

Предпочтительно использовать предметные стекла с керамическими кольцами (ободками) диаметром около 14 мм. Однако можно применять и стеклянные пластинки, разделенные на квадраты со сторонами по 2,5 см карандашом-стеклографом. Лиофилизированную антисыворотку разводят в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. В одно из колец помещают каплю антисыворотки, а в другое — каплю физиологического раствора (0,85% NaCl) или нормальной сыворотки кролика. Выросшую культуру снимают петлей с поверхности агара и смешивают с каждой из капель до получения однородной клеточной суспензии без сгустков. Суспензия должна быть мутной, но не слишком густой. Пластинку покачивают с вращением в течение 1 мин для перемешивания клеток и жидкости, следя за тем, чтобы не расплескать суспензию, а затем проверяют ее визуально, рассматривая при ярком свете на темном фоне. Положительная реакция: клетки, взаимодействующие с антисывороткой, образуют комки (т. е. суспензия выглядит гранулированной или, при сильном взаимодействии, даже «свернувшейся»). Сгустки лучше всего видны при слегка наклонном положении стекла, когда жидкость стекает к его нижней границе. В контрольном опыте с физиологическим раствором или нормальной сывороткой слипания клеток не происходит. Если же оно все-таки наблюдается, то это может свидетельствовать о том, что имеют дело с шероховатой формой (R) вместо гладкой (S).

Примечание: смесь бактерий и антисыворотки не должна высыхать, так как иначе невозможно наблюдать какие-либо признаки агглютинации. Если смесь все же подсыхает, то опыт повторяют с большим количеством антисыворотки.

Предостережение: после завершения опыта пластинку погружают в контейнер с дезинфицирующим раствором (например, с 1%-ным лизолом). Руки и стол моют дезинфицирующим раствором. Это важно, так как во время смешивания клеток с антисывороткой мелкие капельки могут разбрызгаться по стеклу и попасть на поверхность стола. Антисыворотка не убивает бактерии.

Преципитиновый тест для идентификации стрептококков

Культуру выращивают в 40 мл бульона Тодда — Хьюитта (разд. 20.3.33) в пластмассовых (поликарбонатных или полипропиленовых) центрифужных пробирках объемом 50 мл с завинчивающимися крышками. После инкубации при 37 °С в течение 18—24 ч культуру центрифугируют в бакет-роторе при максимальной скорости. Надосадочную жидкость осторожно сливают в колбу Эрленмейера с дезинфицирующим раствором и протирают крышку центрифужной пробирки полотенцем, смоченным дезинфицирующим раствором. Следует убедиться в том, что вся надосадочная жидкость слита и взмучивания осадка во время сливания не было. К осадку добавляют 0,5 мл физиологического раствора (0,85% NaCl) и суспендируют его, осторожно покачивая пробирку из стороны в сторону. Плотнo завинчивают крышку и автоклавируют 15 мин при 121 °С. Снова центрифугируют при максимальной скорости, чтобы осадить автоклавированные клетки. Стараясь не взболтать осажденные клетки, переносят большую часть надосадочной жидкости с помощью пастеровской пипетки в маленькую пробирку. Жидкость должна быть совершенно прозрачной; если она мутная, ее снова центрифугируют. В надосадочной жидкости содержатся растворимые антигены, экстрагированные из клеточных стенок стрептококков.

К антисыворотке добавляют воду согласно инструкции фирмы-изготовителя. В полученный раствор погружают в наклонном положении капиллярную трубку (с внутренним диаметром 0,7—1,0 мм и длиной 75—90 мм) так, чтобы столбик сыворотки в ней достиг высоты 2—3 см. Закрыв противоположный конец указа-

тельным пальцем, капилляр извлекают из флакона с сывороткой и вытирают его внешнюю поверхность для удаления избыточной сыворотки. Затем конец капилляра с антисывороткой погружают в экстракт антигена и, убрав указательный палец, набирают 2—3 см раствора антигена. При продвижении экстракта вверх по капилляру между столбиками антисыворотки и антигена не должен попадать воздух. Закрывают конец капилляра указательным пальцем и капилляр вынимают. Наклоняют его почти горизонтально и, убрав палец, позволяют столбику жидкости двигаться к центральной части капилляра. У каждого конца трубки должно остаться не меньше 1 см воздуха. Один конец капилляра погружают в глину для лепки. Стирают с поверхности капилляра отпечатки пальцев и инкубируют 10—15 мин. Капилляр осматривают при ярком свете на темном фоне с помощью ручной лупы. Положительная реакция: появление легкого помутнения молочного цвета в центре капилляра на стыке антисыворотки и экстракта. При дальнейшей инкубации это помутнение увеличивается и на дне столбика жидкости выпадает осадок.

Реакция Квеллунга

Бульонную культуру наносят петлей на чистое предметное стекло и оставляют для высыхания на воздухе без подогревания. (Если в такой же мазке, окрашенном кристаллическим фиолетовым, присутствует более чем 15—25 клеток при просмотре в микроскоп с иммерсией, культуру следует разбавить, так как при слишком высокой концентрации клеток можно получить неточный результат.) К антисыворотке добавляют воду и наносят полученный раствор петлей на покровное стекло. Одну петлю 1%-ного водного раствора метиленового синего смешивают с антисывороткой и кладут покровное стекло каплей вприз на предметное стекло с высушенным мазком. Смотрят препарат в микроскоп с масляной иммерсией. Положительная реакция: капсулы вокруг окрашенных в синий цвет клеток становятся четко очерченными. Всегда следует проводить сравнение с контрольным препаратом, приготовленным с нормальной кроличьей сывороткой вместо антисыворотки. Если резуль-

таты теста отрицательные, необходимо повторить осмотр через 1 ч. Препарат предохраняют от высыхания, выдерживая его во влажной камере или герметизируя по краю покровного стекла расплавленным вазпаром (смесью из равных объемов петролатума и вазелинового масла).

Тест с использованием флуоресцирующих антител

Флуоресцирующую антисыворотку («конъюгат») и флуоресцирующую нормальную сыворотку растворяют в воде. Готовят несколько порций флуоресцирующей антисыворотки, разбавляя ее каждый раз вдвое (например, 1 : 5; 1 : 10; 1 : 20; 1 : 40; 1 : 80) в фосфатном буфере с добавлением NaCl [фосфатно-солевой буфер (ФСБ), см. разд. 20.4.17]. При каждом разведении антисыворотки с помощью метода окрашивания, описанного ниже, а также с помощью подходящего флуоресцентного (люминесцентного) микроскопа (разд. 1.4) определяют степень флуоресценции бактериальных клеток по шкале 0, 1+, 2+, 3+, 4+ (максимум). Рабочее разведение антисыворотки составляет $\frac{1}{2}$ максимального разведения, которое дает степень флуоресценции 4+. Например, если максимальная степень флуоресценции 4+ достигается при разведении сыворотки 1 : 20, то рабочее разведение равно 1 : 10. Эквивалентное разведение флуоресцирующей нормальной сыворотки не должно давать флуоресценции.

Молодую бульонную культуру испытуемого микроорганизма центрифугируют и надосадочную жидкость сливают. Клетки суспендируют в ФСБ и вновь центрифугируют. К осадку добавляют небольшое количество ФСБ, чтобы получилась густая суспензия клеток. С помощью алмазного или карбидно-вольфрамового карандаша очерчивают круг диаметром $\frac{1}{4}$ размера предметного стекла. Стекло тщательно обезжиривают и внутри окружности делают мазок одной петлей бактериальной суспензии. Мазок высушивают на воздухе без нагревания, помещают предметное стекло на 1 мин в сосуд с 95%-ным этанолом, вынимают его и сушат на воздухе.

На мазок капают несколько капель рабочего раствора флуоресцирующей антисыворотки. Распределяют

антисыворотку по мазку аппликатором, не касаясь мазка. Стекло препаратом вверх помещают в чашку Петри, к крышке которой прикреплен влажный кружок фильтровальной бумаги; такая чашка служит влажной камерой, в которой предотвращается высыхание антисыворотки. Инкубируют при 37°C 15—20 мин.

Избыток антисыворотки сливают, наклоня предметное стекло над фильтровальной бумагой. Затем стекло помещают в сосуд с ФСБ на 10 мин, периодически поднимая и опуская. Эту процедуру повторяют еще 2 раза, используя каждый раз сосуд со свежим ФСБ. После третьего погружения в ФСБ стекло опускают один раз в сосуд с дистиллированной водой для удаления ФСБ, сразу же промокают (не вытирают) фильтровальной бумагой и высушивают. На мазок наносят небольшую каплю забуференного глицерина (разд. 20.4.2) и накрывают его покровным стеклом. Просматривают мазок в люминесцентный микроскоп (разд. 1.4) при большом увеличении с масляной иммерсией или без нее. Когда смотрят с иммерсией, применяют только нефлуоресцирующее масло (разд. 1.5).

Параллельно с окрашиванием испытуемого микроорганизма по той же методике готовят две контрольные пробы. Одну с рабочим раствором флуоресцирующей антисыворотки и известной бактерией, а другую с испытуемым микроорганизмом и раствором флуоресцирующей нормальной сыворотки. Степень флуоресценции первой контрольной пробы составляет 4+, во второй пробе не должно быть флуоресценции.

Примечание: при рассматривании мазков в люминесцентный микроскоп следует часто менять поле, так как при наблюдении одного и того же поля флуоресценция быстро затухает (приблизительно через 15 с). Наиболее яркая флуоресценция наблюдается в тот момент, когда в фокус объектива попадает новое поле.

Примечание: следует всегда пользоваться свежеприготовленным рабочим раствором флуоресцирующей антисыворотки. Неразведенная исходная сыворотка стабильна при хранении в холодильнике при температуре ниже +8°C.

20.3. СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

20.3.1. Среда А [51]

Пептон	20,0 г	Агар (сухой)	13,6 г
Глицерин	10,0 мл	Дистиллированная	1000 мл
K_2SO_4 (безводный)	10,0 г	вода	
$MgCl_2$ (безводный)	1,4 г		

Компоненты смешивают и доводят рН до 7,2. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием при 121°С в течение 15 мин. Охлаждают в наклонном положении.

20.3.2. Аргининовый бульон Нивена и др. [67]

Дрожжевой экстракт	5,0 г	Глюкоза (декстроза)	0,5 г
Триптон	5,0 г	L-аргинин·HCl	3,0 г
K_2HPO_4	2,0 г	Дистиллированная	1000 мл
		вода	

(Примечание: хотя в оригинальной методике используется D-аргинин, можно также добавлять L-форму [3].)

Компоненты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят рН до 7,0, кипятят, фильтруют и стерилизуют автоклавированием.

20.3.3. Аргининовый бульон Эванса и Нивена [33]

Триптон	10,0 г	L-аргинин·HCl	3,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г	Дистиллированная	1000 мл
NaCl	5,0 г	вода	

Компоненты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят рН до 7,0, кипятят, фильтруют и стерилизуют автоклавированием.

20.3.4. Полужидкая безазотная среда с малатом для *Azospirillum* [30]

KH_2PO_4	0,4 г	L-яблочная кислота (или малат натрия)	3,58 г (5,00 г)
K_2HPO_4	0,1 г	Бромтимоловый синий, 0,5%-ный спиртовой раствор	5,0 мл
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г		
NaCl	0,1 г		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,026 г	Агар	1,75 г
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,017 г	Дистиллированная вода	1000 мл
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,002 г		

Компоненты смешивают и доводят рН до 6,8 с помощью КОН. Стерилизуют автоклавированием. *Примечание:* некоторые штаммы *Azospirillum* нуждаются в добавлении дрожжевого экстракта (0,005 %) в качестве источника витаминов.

20.3.5. Среда Б [51]

Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г	K ₂ HPO ₄	1,5 г
Пептический гидролизат животных тканей USP	10,0 г	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 г
		Агар (сухой)	14,0 г
		Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят рН до 7,2. Кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 мин. Охлаждают в наклонном положении.

20.3.6. Агар с желчью [3]

Экстракт из говяжьего мяса	10,0 г
Пептон	10,0 г
NaCl	5,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят рН до 8,0—8,4 добавлением 10 н. NaOH. Кипятят 10 мин, фильтруют, доводят рН до 7,2—7,4 и добавляют 10,0 г дегидратированной бычьей желчи. При необходимости вновь доводят рН до 7,2—7,4. Добавляют 15,0 г агара, кипятят и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до 55 °С и добавляют с соблюдением правил асептики 50 мл стерильной сыворотки крови. Перемешивают и разливают в чашки. *Примечание:* 1 % дегидратированной бычьей желчи = 10 % (по объему) жидкой желчи; для получения 40 %-ного агара с желчью берут 4 % дегидратированной бычьей желчи.

20.3.7. Кровяной агар

К стерильной расплавленной и охлажденной до 45—50 °С основе кровяной агаровой среды (разд. 20.3.31) добавляют 5 % (по объему) стерильной дефибриниро-

ванной крови, хорошо перемешивают и разливают в чашки. Чашки с пузырьками воздуха или пеной на поверхности не используют. Обычно предпочитают овечью или кроличью кровь. Лошадиная кровь может давать искаженные гемолитические реакции. Донорская кровь человека, хранящаяся в банках крови, содержит цитрат и глюкозу; цитрат может быть ингибитором роста некоторых бактерий, а глюкоза может давать ложную реакцию с появлением зеленой окраски в отсутствие истинного α -гемолиза. Кровь, используемая для приготовления кровяного агара, не должна содержать антибиотики или химиотерапевтические препараты.

Дефибринированную кровь готовят следующим образом: в стерильных условиях отбирают кровь шприцем с иглой № 18 (для предотвращения гемолиза, вызываемого механическим разрушением) и немедленно переливают ее в стерильную колбу, в которую помещен слой стерильных стеклянных шариков (диаметром около 3 мм). Колбу встряхивают в горизонтальной плоскости в течение 10 мин. Фибрин, образовавшийся во время свертывания, остается на шариках. Надосадочную жидкость, содержащую клетки крови и сыворотку, сливают в стерильный сосуд и хранят в холодильнике.

20.3.8. Среда Борда и Холдинга [20]

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5 г	Раствор минеральных элементов	20 мл
K_2HPO_4	0,5 г	(разд. 20.3.18)	
Дрожжевой экстракт	0,5 г	Агар	5,0 г
Бромтимоловый синий	0,03 г	Дистиллированная вода	880 мл

Сначала растворяют первые три компонента в дистиллированной воде, а затем добавляют индикатор и раствор минеральных элементов. Доводят рН до 7,2. Добавляют агар и смесь кипятят до растворения. Разливают по 9,0 мл в пробирки и стерилизуют, поместив на мгновение в автоклав с давлением водяного пара $1,54 \cdot 10^5$ Па. Охлаждают до 45—50 °С. Во время автоклавирования может образоваться осадок, который при охлаждении растворяется. В каждую пробирку добав-

ляют 1,0 мл 5%-ного раствора углевода (обычно глюкозы), заранее простерилизованного фильтрованием. Среду перемешивают и оставляют охлаждаться.

20.3.9. Модифицированная среда Бёрка [73]

Раствор А:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,00024 г
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 г	Глюкоза	10,0 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 г	Дистиллированная вода	500 мл

Раствор Б:

Калий-фосфатный буфер, 0,005 М, рН 7,1 500 мл

Растворы А и Б автоклавируют отдельно и после охлаждения смешивают их в соотношении 1 : 1.

20.3.10. Предварительно восстановленный бульон с рубленным мясом [7]

Рубленая говядина (используют простую говядину без жира) или конина	500 г
Дистиллированная вода	1000 мл
NaOH, 1 и.	25 мл

Мясо измельчают, предварительно удалив жир и пленки, смешивают его с водой и NaOH и доводят смесь до кипения, постоянно перемешивая. Охлаждают до комнатной температуры, снимают с поверхности жир и фильтруют. Отдельно сохраняют осадок и фильтрат. К фильтрату добавляют дистиллированную воду в количестве, необходимом для восстановления первоначального объема (1 л), и затем следующие компоненты:

Триптиказу	30,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
K_2HPO_4	5,0 г
Раствор ресазурина (0,025%)	4,0 мл

Смесь кипятят в колбе с отводом (для предотвращения перекипания). В 1-л колбу наливают 750 мл бульона, а в 750-мл колбу 500 мл бульона. Кипятят до изменения окраски ресазурина от розовой до бесцветной.

Снимают колбу с огня и вместо отвода устанавливают форштосс с двумя отводами и газоотводной трубкой в одном из них. Во время охлаждения среды до комнатной температуры в ледяной бане через нее пропускают очищенный от кислорода углекислый газ. На 1 л среды добавляют следующие ингредиенты:

Цисгеин	0,5 г
Раствор гемина (разд. 20.3.28)	10 мл
Раствор витамина К ₁ (разд. 20.3.28)	0,2 мл

Доводят рН до 7,2, добавляя 8 н. NaOH. Продолжают пропускание CO₂ до тех пор, пока рН не снизится до 7,0. Затем через среду пропускают азот, очищенный от кислорода, и одновременно разливают ее в пробирки размером 18×142 мм, через которые предварительно пропускали молекулярный азот (Bellco Glass Inc., Vineland, N. J.). В пробирках уже должны находиться кусочки приготовленного ранее мяса (1 часть мяса на 4—5 частей бульона). После удаления газоотводной трубки пробирки закрывают черными резиновыми пробками (№ 1), автоклавируют 30 мин, используя прижимные устройства (для того чтобы не вылетели пробки) и затем охлаждают. Пробирки, в которых при хранении развивается бледно-розовая окраска, свидетельствующая об окислении среды, выбраковывают.

20.3.11. Цитратный агар Кристенсена [26]

Цитрат натрия	3,0 г	КН ₂ РO ₄	1,0 г
Глюкоза	0,2 г	NaCl	5,0 г
Дрожжевой экстракт	0,5 г	Тиосульфат натрия	0,08 г
Гидрохлорид цистина	0,1 г	Феноловый красный	0,012 г
		Агар	15,0 г
Цитрат железа(II)-аммония	0,4 г	Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят рН до 6,7. Стерилизуют автоклавированием. Охлаждают в наклонном положении, так чтобы высота застывшего столбика составляла 2,5 см, а длина скошенной части агара была бы равна 3,8 см.

20.3.12. Агар Кристенсена с мочевиной [25]

Пептон	1,0 г	Феноловый красный	0,012 г
Глюкоза	1,0 г	Агар	20,0 г
NaCl	5,0 г	Дистиллированная вода	1000 мл
KH ₂ PO ₄	2,0 г	Дрожжевой экстракт (не во всех случаях)	(0,1 г)

Компоненты смешивают и доводят рН до 6,8—6,9. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до 50°С. Добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество 20%-ного раствора мочевины (стерилизованного фильтрованием) до конечной концентрации 2%. Перемешивают и с соблюдением правил асептики разливают по 2—3 мл в стерильные небольшие пробирки. Охлаждают в наклонном положении, при котором высота столбика равна 1,3 см, а длина скошенной части 2,5 см.

20.3.13. Безазотная среда для *Clostridium pasteurianum* [28]

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0493 г	K ₂ HPO ₄	1,132 г
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,0541 г	Биотин	Следы
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,0034 г	Сахароза	20,0 г
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0048 г	CaCO ₃	3,0 г
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00058 г	Дистиллированная вода	1000 мл
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00050 г		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,00048 г		

(Примечание. Для повышения буферности можно увеличить количество CaCO₃ до 30 г.)

Компоненты смешивают и автоклавируют. Перед инокулированием в среде необходимо создать анаэробные условия, пропуская через нее газообразный азот, очищенный от кислорода.

20.3.14. Желточный агар [7]

Пептон	20,0 г	Глюкоза	1,0 мл
Na ₂ HPO ₄	2,5 г	Агар	12,5 г
NaCl	1,0 г	Дистиллированная вода	500 мл
MgSO ₄ , 0,5%-ный (вес/объем) рас- твор	0,1 мл		

Компоненты смешивают, рН смеси доводят до 7,3—7,4. Смесь кипятят для растворения агара, стерилизуют автоклавированием и охлаждают до 60°C в водяной бане. Скорлупу яйца дезинфицируют спиртом и дают ей обсохнуть. Яйцо разбивают и отделяют желток от белка. Желток с соблюдением правил асептики переносят в расплавленный агар и перемешивают до получения однородной суспензии. Разливают в чашки и оставляют для затвердения. Работая с анаэробными организмами, чашки используют в течение 4 ч после приготовления или хранят их в анаэробном боксе.

20.3.15. Бульон Хейнса [42]

Триптон	1,5 г
Дрожжевой экстракт	1,0 г
K ₂ HPO ₄	1,0 г
Глюконат калия	40,0 г

Компоненты смешивают, доводят рН смеси до 7,0 и стерилизуют фильтрованием.

20.3.16. Безазотная среда Хино и Уилсона для *Bacillus* [43]

Раствор А:

Сахароза	20,0 г	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 г	CaCO ₃	10,0 г
NaCl	0,01 г	Дистиллированная вода	500 мл
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015 г		

Раствор Б:

<i>n</i> -Аминобензойная кислота	10,0 мкг
Биотин	5 мкг
K ₂ HPO ₄ —KH ₂ PO ₄ , 0,1 М буфер, рН 7,7	500 мл

Растворы А и Б автоклавируют отдельно. После охлаждения смешивают с соблюдением правил асептики равные объемы растворов.

20.3.17. Среда для теста О/Ф по Хью и Лейфсону [44]

Пептон (панкреатический гидролизат казеина)	2,0 г	Бромтимоловый синий	0,03 г
NaCl	5,0 г	Агар	3,0 г
K ₂ HPO ₄	0,3 г	Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и рН смеси доводят до 7,1. Смесь кипятят для растворения агара и разливают по 3—4 мл в пробирки размером 13×100 мм. Стерилизацию проводят в автоклаве. Пробирки охлаждают до 45—50°C и в каждую пробирку добавляют 10%-ный раствор углевода (обычно глюкозы), стерилизованного фильтрованием, до конечной концентрации 1,0%. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют для остывания.

20.3.18. Минеральная основа по Хатнеру [27]

Минеральный раствор:

Нитрилотриуксусная кислота	10,0 г
MgSO ₄	14,45 г
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,335 г
(NH ₄) ₄ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,00925 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,099 г
Основной солевой раствор	50 мл
Дистиллированная вода	950 мл

Основной солевой раствор:

ЭДТА	2,5 г
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10,95 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,0 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,54 г
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,392 г
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,248 г
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,177 г
Дистиллированная вода	1000 мл

К основному солевому раствору добавляют несколько капель H₂SO₄ для предотвращения осаждения. При приготовлении минерального раствора нитрилотриуксусную кислоту растворяют в дистиллированной воде и нейтрализуют, добавляя приблизительно 7,3 г КОН. Вносят остальные компоненты и доводят рН до 6,8.

20.3.19. Модифицированная Лейфсоном среда для теста О/Ф (MOF) [55]

Казитон Difco	1,0 г	Агар	3,0 г
Дрожжевой экстракт	0,1 г	Искусственная мор-ская вода	500 мл
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 г	(разд. 20.3.29)	
Трис	0,5 г	Дистиллированная вода	500 мл
Феноловый красный	0,01 г		

Компоненты растворяют в дистиллированной воде, доводят рН смеси до 7,5 и стерилизуют автоклавируанием. Морскую воду автоклавируют отдельно. Охлаждают оба раствора до 45—50°C и сливают их с соблю-

дением правил асептики. Добавляют 10- или 20%-ный раствор подходящего углевода (обычно глюкозы), стерилизованного путем фильтрования, до конечной концентрации 0,5 или 1,0%. Среду разливают с соблюдением правил асептики по 2,5—3,0 мл в пробирки размером 13×100 мм и оставляют для охлаждения.

20.3.20. Лакмусовое молоко [12]

Спиртовой раствор лакмуса. 50 г лакмуса измельчают в ступке с 150 мл 40%-ного этанола. Смесь переливают в колбу и осторожно кипятят 1 мин в паровой бане. Жидкость декантируют и хранят отдельно. К осадку добавляют еще 150 мл 40%-ного этанола и снова кипятят 1 мин. Надосадочную жидкость декантируют и объединяют с предыдущей порцией. Объединенную порцию оставляют на ночь и затем разбавляют 40%-ным этанолом до 300 мл. Доводят рН до 7,0, добавляя по капле 1 н. HCl.

Приготовление среды. В снятое молоко добавляют достаточное количество лакмуса до появления сине-фиолетовой окраски (обычно 40 мл на 1 л). Доводят рН смеси до 7,0, добавляя 1 н. NaOH. Стерилизуют автоклавированием при 115 °С в течение 10 мин. Перегревание приводит к карамелизации.

20.3.21. Малонатный бульон [34]

Дрожжевой экстракт	1,0 г	Малонат натрия	3,0 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 г	Глюкоза	0,25 г
K ₂ HPO ₄	0,6 г	Бромтимоловый син-	0,025 г
KH ₂ PO ₄	0,4 г	ний	
NaCl	2,0 г	Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 7,0. Стерилизуют автоклавированием.

20.3.22. Предварительно восстановленная молочная среда [7]

Свежее снятое молоко	100 мл
Раствор резазурина, 0,025%-ный	0,4 мл
Раствор гемина (разд. 20.3.28)	1,0 мл
Раствор витамина K ₁ (разд. 20.3.28)	0,02 мл

В колбу наливают молоко и ресазурин и готовят среду так же, как пептонно-дрожжевой бульон РУ (разд. 20.3.28). После кипячения и остывания добавляют гемин и витамин К₁. После пропускания СО₂ рН должен быть 7,1. Среду разливают в пробирки, через которые был пропущен газообразный азот, закрывают пробками, помещают в зажимное устройство и автоклавируют при 121 °С в течение 12 мин.

20.3.23. Бульонная основа Мёллера [61]

Пептический гидролизат животной ткани USP	5,0 г
Экстракт из говяжьего мяса	5,0 г
Бромкрезоловый красный, 1,6%-ный раствор	0,625 мл
Крезоловый красный, 0,2%-ный раствор	2,5 мл
Глюкоза	0,5 г
Пиридоксаль	0,005 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Примечание: По оригинальной методике используют специальный пептон Ортана; однако можно применять титон (BBL, пептический гидролизат животной ткани) [10].

Компоненты смешивают, доводят рН смеси до 6,0 или 6,5. Смесь разливают в пробирки размером 13××100 мм и стерилизуют автоклавированием.

20.3.24. Бульон MRVP

Полипептон или забуференный пептон	7,0 г
К ₂ НРО ₄ (см. примечание)	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

(Примечание: При испытании бактерий рода *Bacillus* в реакции Фогес — Проскауера фосфат заменяют 5,0 г NaCl [2].)

Компоненты смешивают и регулируют рН смеси таким образом, чтобы после автоклавирования и охлаждения он был 6,9. Разливают по 5 мл и стерилизуют 10 мин при 121 °С.

20.3.25. Питательный агар

Экстракт из говяжьего мяса	3,0 г
Пептон	5,0 г
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 6,8. Стерилизуют автоклавированием.

20.3.26. Фенилаланиновый агар

Дрожжевой экстракт	3,0 г	NaCl	5,0 г
L-фенилаланин	1,0 г	Агар	12,0 г
Na ₂ HPO ₄	1,0 г	Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 7,3. Кипятят для растворения агара, разливают в пробирки и стерилизуют автоклавированием. Пробирки охлаждают в наклонном положении.

20.3.27. Предварительно восстановленный агар РУ [7]

Готовят бульон РУ (разд. 20.3.28) и разливают его по 10 мл в пробирки, содержащие 0,2 г агара, через которые одновременно пропускают азот, очищенный от кислорода. Снимают газопроводные трубки, пробирки закрывают пробками и автоклавируют 15 мин в зажимном устройстве в автоклаве с быстрым вытеснением воздуха. После автоклавирования среду перемешивают, несколько раз переворачивая пробирки в зажимном устройстве.

20.3.28. Предварительно восстановленный бульон РУ [7]

Пептон	5,0 г
Триптиказа	5,0 г
Дрожжевой экстракт	10,0 г
Ресазурин, 0,25%-ный раствор	4,0 мл
Солевой раствор (см. ниже)	40,0 мл
Раствор гемеина (см. ниже)	10,0 мл
Раствор витамина К ₁ (см. ниже)	0,2 мл
Цистеин·HCl	0,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Солевой раствор: 0,2 г CaCl₂ (безводный); 0,48 г MgSO₄·7H₂O; 1,0 г K₂HPO₄; 1 г KH₂PO₄; 10,0 г NaHCO₃; 2,0 г NaCl. CaCl₂ и MgSO₄ растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Вливают 500 мл дистиллированной воды и, помешивая, добавляют остальные соли. После растворения солей добавляют 200 мл дистиллированной воды.

Раствор гемеина: 0,05 г гемеина растворяют в 1 мл 1 н. NaOH. Объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Автоклавируют 15 мин при 121 °С.

Раствор витамина К₁: 0,15 мл витамина К₁ растворяют в 30 мл 95%-ного этанола.

Для приготовления бульона РУ сухие ингредиенты (кроме цистеина) помещают в колбу с вертикальным отводом, предназначенным для предотвращения перекипания. Для приготовления 750 мл среды используют 1-л колбу, а для приготовления 500 мл среды — 750-мл колбу. Добавляют воду, солевой раствор и ресазурин. Кипятят до тех пор, пока розовая окраска ресазурина не станет бесцветной. Снимают колбу с огня и вместо отвода устанавливают форштосс с двумя отводами, в один из которых вставлена газоотводная трубка. Во время охлаждения среды в ледяной бане до комнатной температуры через нее пропускают очищенный от кислорода углекислый газ. Добавляют растворы гемина, витамина К₁ и цистеина. Доводят рН смеси до 7,1 с помощью 8 н. NaOH. Пропускание СО₂ продолжают до тех пор, пока рН не снизится до 6,9. Затем, пропуская через среду очищенный от кислорода азот, ее разливают в пробирки размером 18×142 мм (Bellco Glass, Inc.), через которые предварительно уже был пропущен азот. После извлечения газоотводной трубки пробирки закрывают черными резиновыми пробками (№ 1). Автоклавизируют в течение 15 мин в зажимном устройстве в автоклаве с быстрым вытеснением воздуха и затем охлаждают. Пробирки, в которых среда окрашивается в бледно-розовый цвет, свидетельствующий о ее окислении, выбраковывают.

20.3.29. Искусственная морская вода

Состав 1 [74]:

NaCl	27,5 г	KCl	1,0 г
MgCl ₂	5,0 г	FeSO ₄	0,001 г
MgSO ₄	2,0 г	Дистиллированная	1000 мл
CaCl ₂	0,5 г	вода	

Состав 2 [100]:

NH ₄ NO ₃	0,002 г	NaCl	24,320 г
H ₃ BO ₃	0,027 г	NaF	0,003 г
CaCl ₂	1,140 г	Na ₂ SiO ₃	0,002 г
FePO ₄	0,001 г	Na ₂ SO ₄	4,060 г
MgCl ₂	5,143 г	SrCl ₂	0,026 г
KBr	0,100 г	Дистиллированная	1000 мл
KCl	0,690 г	вода	
NaHCO ₃	0,200 г		

20.3.30. Цитратный агар Симмонса [84]

Цитрат натрия	2,0 г	K_2HPO_4	1,0 г
NaCl	5,0 г	Бромтимоловый синий	0,08 г
$MgSO_4$	0,2 г	Агар	15,0 г
$NH_4H_2PO_4$	1,0 г	Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят pH смеси до 6,9. Кипятят для растворения агара, разливают в пробирки и стерилизуют автоклавированием. Пробирки остывают в наклонном положении.

20.3.31. Агар с соево-казеиновым гидролизатом

Панкреатический гидролизат казеина USP	15,0 г
Папайновый гидролизат соевой муки USP	5,0 г
NaCl	5,0 г
Агар	15,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Компоненты смешивают и доводят pH смеси до 7,3. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием. (Примечание: эта среда известна также под названием триптоно-соевый агар или триптиказо-соевый агар; его можно использовать в качестве основы для кровяного агара.)

20.3.32. Полужидкая аргининовая среда Торнли [91]

Пептон	1,0 г	L-аргинин·HCl	10,0 г
NaCl	5,0 г	Агар	3,0 г
K_2HPO_4	0,3 г	Дистиллированная вода	1000 мл
Феноловый красный	0,01 г		

Компоненты смешивают и доводят pH смеси до 7,2. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием.

20.3.33. Модифицированный бульон Тодда — Хьюитта [35]

Экстракт из сердца быка	1000 мл
Неопептон	20,0 г

Компоненты смешивают, и доводят pH смеси до 7,0 с помощью 1 н. NaOH. Затем добавляют:

NaCl	2,0 г	Na_2HPO_4	0,4 г
$NaHCO_3$	2,0 г	Глюкозу	2,0 г

Доводят рН смеси до 7,8. Смесь кипятят 15 мин, фильтруют через бумагу и разливают в пробирки. Стерилизуют автоклавированием 10 мин при 121°C.

20.3.34. Агар с тремя углеводами и железом

Панкреатический гидролизат казеина USP	10,0 г
(см. примечание)	
Пептический гидролизат животной ткани USP	10,0 г
(см. примечание)	
Глюкоза	1,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Сульфат железа(II)- или сульфат железа(III)-аммония	0,2 г
NaCl	5,0 г
Тиосульфат натрия	0,3 г
Феноловый красный	0,024 г
Агар	13,0 г
Дистиллированная вода	1000 мл

(Примечание. Первые два компонента можно заменить следующими: экстракт из говяжьего мяса — 3,0 г; дрожжевой экстракт — 3,0 г; пептон — 20,0 г.)

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 7,3. Смесь кипятят для растворения агара и разливают в пробирки. Стерилизуют автоклавированием 15 мин при 121°C. Охлаждают, наклонив пробирки так, чтобы высота столбика агара составляла 2,5 см, а длина скошенной части — 3,8 см.

20.3.35. Безазотная среда для *Klebsiella* Иоча и Пенгры [99]

Раствор А:

Na ₂ HPO ₄	6,25 г
KH ₂ PO ₄	0,75 г
Дистиллированная вода	500 мл

Раствор Б:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	6,25 г	Сахароза	20,0 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,04 г	NaCl	8,5 г
Na ₂ MoO ₄ (безводный)	0,005 г	Дистиллированная вода	500 мл

Растворы А и Б автоклавируют отдельно и после охлаждения объединяют их равные объемы с соблюдением правил асептики.

20.4. РЕАКТИВЫ

20.4.1. Реактив Бенедикта

Цитрат натрия	17,3 г
Na_2CO_3	10,0 г
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,73 г

Первые два компонента растворяют при нагревании в 80 мл воды. Смесь фильтруют, разбавляют до 85 мл. Растворяют CuSO_4 в 10 мл воды и, помешивая, переливают в карбонатно-цитратный буфер. Общий объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

20.4.2. Забуференный раствор глицерина для монтирования микроскопических препаратов

Глицерин	90 мл
Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (разд. 20.4.17)	10 мл

Компоненты смешивают и доводят рН смеси до 8,0, добавляя NaOH . Сосуд с раствором плотно закупоривают для предотвращения абсорбции двуокиси углерода. Свежие растворы следует готовить каждый месяц.

20.4.3. Угольно-желатиновые диски [52]

15 г дегидратированной пищевой желатины (Difco Laboratories) смешивают со 100 мл водопроводной воды и смесь нагревают для растворения желатины. Добавляют 3—5 г мелко измельченного активированного угля, смесь хорошо встряхивают и разливают в чашки Петри слоем толщиной 3 мм. Смесь разливают достаточно охлажденной, для того чтобы она быстро затвердела до осаждения активированного угля. Рекомендуются перед разливом желатины смазывать дно чашки очень тонким слоем петролатума. После того как смесь затвердеет, ее вынимают из чашки и помещают в 10-%ный раствор формалина на 24 ч. Затем вырезают из затвер-

девшей желатины диски диаметром 1 см или полоски шириной 5—8 и длиной 20 мм. Полоски и диски заворачивают в марлю, опускают в сосуд, который помещают под кран с водой на 24 ч. Затем их кладут в бутылки с завинчивающимися крышками, заливают водой и стерилизуют 30 мин паром или повторным нагреванием в течение 20 мин в водяной бане при 90—100 °С (не автоклавируют!). После стерилизации сливают воду и помещают полоски или диски с соблюдением правил асептики в стерильные среды (по 1 полоске в пробирку). Среда инкубируют для проверки на стерильность, после чего они готовы для инокулирования.

20.4.4. Проявляющий раствор для аргинина [77]

α -Нафтол, 25%-ный (вес/объем) раствор в <i>n</i> -пропаноле	20 мл
Диацетил, 1%-ный (вес/объем) раствор в <i>n</i> -пропаноле	2,5 мл

Компоненты смешивают и разбавляют *n*-пропанолом до 100 мл.

20.4.5. Реактив Эрлиха

<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид	1,0 г
Этанол, 95%-ный раствор	95 мл
HCl (конц.)	20 мл

Альдегид растворяют в этаноле и затем добавляют кислоту. Хранят в холодильнике в защищенном от света месте.

20.4.6. Формиат-фумарат (Ф-Ф) [7]

Формиат натрия	3,0 г
Фумаровая кислота	3,0 г
Дистиллированная вода	50 мл

Компоненты смешивают. Добавляют 20 гранул NaOH, размешивают до растворения этих гранул и фумаровой кислоты. Доводят pH смеси до 7,0, добавляя около 15 капель 4 н. NaOH, и стерилизуют фильтрованием.

Краситель растворяют в воде. Раствор экстрагируют приблизительно равными объемами хлороформа до тех пор, пока хлороформ не станет бесцветным (обычно 6—8 раз). Полученный водный раствор метилового зеленого хранят при 4 °С. Краситель можно добавлять в среду для определения ДНКазы перед автоклавированием или его стерилизуют фильтрованием и добавляют с соблюдением правил асептики в автоклавированную среду при 45—50 °С.

20.4.10. Раствор Несслера

КІ	5,0 г
Дистиллированная вода,	5,0 мл
безаммиачная	

КІ растворяют в воде и добавляют насыщенный раствор HgCl_2 (около 2,0 г в 35 мл) до образования осадка, свидетельствующего об избытке HgCl_2 . Затем добавляют 20 мл 5 н. NaOH и смесь разбавляют до 100 мл. После оседания осадка сливают прозрачную надосадочную жидкость.

20.4.11. Использование нильского голубого сернокислого для окрашивания жиров [12]

Раствор нильского голубого сернокислого. Готовят насыщенный водный раствор нильского голубого сернокислого. Добавляют 1 н. NaOH по каплям до прекращения образования осадка. Фильтруют и промывают осадок дистиллированной водой при рН 7,5. Высушивают и хранят до использования.

Окрашивание жира. Готовят насыщенный раствор оксазинового основания нильского голубого сернокислого, используя приготовленный ранее сухой осадок. Смешивают 1 мл раствора с 10 мл жира (триптопионина, трибутирина, трикапроина, трикаприлина, триолеина, говяжьего сала, молочного жира, кокосового, кукурузного, хлопкового масла, свиного жира, льняного или оливкового масла). При необходимости смесь помещают в подогреваемую водяную баню для поддержания жира в жидком состоянии в течение всей последующей процедуры промывания.

Процедура промывания. В случае жиров, находящихся при комнатной температуре в жидком состоянии, к смеси красителя и жира в делительной воронке добавляют 2 объема диэтилового эфира. Эфирный красный слой отделяют от слоя воды и несколько раз промывают его водой. (*Осторожно:* эфир легко воспламеняется! Все процедуры с эфиром проводят в вытяжном шкафу, избегая огня или искр, в присутствии которых может произойти взрыв.) Наконец, отделяют эфирный слой, в котором находится жир, и выпаривают эфир. Отделяют жир от остатков воды, стерилизуют его автоклавированием и хранят в холодильнике. Перед применением добавляют 1 мл окрашенного жира к 10 мл расплавленной стерильной основной среды, хорошо перемешивают и разливают в чашки.

В случае жиров, находящихся при комнатной температуре в твердом состоянии, смесь красителя с жиром промывают несколько раз горячей водой и затем разливают жир в расплавленный нейтральный 0,5%-ный агар — по 10 мл жира на 90 мл агара. Стерилизуют автоклавированием. Перед использованием жир растапливают и вносят 1 мл жировой эмульсии в 20 мл расплавленной стерильной основной среды. Смесь хорошо перемешивают и разливают в чашки.

20.4.12. Реактивы для теста на присутствие нитритов

Метод 1.

Раствор А:

N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид (Sigma 0,02 г
Chemical Co.)

HCl, 1,5 н. раствор 100 мл

Смесь растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Раствор Б:

Сульфаниловая кислота 1,0 г

HCl, 1,5 н. раствор 100 мл

Растворяют, осторожно нагревая на слабом огне.

Реактив получают, смешивая равные объемы растворов А и Б непосредственно перед использованием.

Метод 2.

Раствор А:

N,N-диметил-1-нафтиламиндигидрохлорид (Sigma Chemical Co.)	0,6 г
(или нафтиламин)	(0,5 г)
5 н. CH_3COOH	100 мл

Растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Раствор Б:

Сульфаниловая кислота	0,8 г
5 н. CH_3COOH	100 мл

Растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Осторожно: Управление по профессиональной безопасности и здоровью (OSHA) объявило α -нафтиламин канцерогеном. Хотя N-(1-нафтил)-этилендиамин и N,N-диметил-1-нафтиламин не включены в список канцерогенов, их также можно считать опасными ввиду структурного сходства с α -нафтиламином. Поэтому следует соблюдать все предосторожности в отношении использования, обработки и последующего уничтожения этих соединений.

20.4.13. Реактив ОНФГ

Раствор А:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,9 г
NaOH, 30%-ный (вес/объем) раствор	3 мл
Дистиллированная вода	45 мл

Фосфат натрия растворяют в дистиллированной воде. Добавляя NaOH, доводят pH раствора до 7,0. Разбавляют дистиллированной водой до 50 мл и хранят при 4°C.

Реактив для испытания:

o-Нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ОНФГ; Sigma Chemical Co)	0,080 г
Дистиллированная вода	15 мл
Раствор А (см. выше)	5 мл

ОНФГ растворяют в дистиллированной воде при 37°C. К раствору добавляют фосфат натрия и хранят его при 4°C. Перед использованием раствор нагревают до 37°C.

20.4.14. pH-Индикаторы для культуральных сред

Список pH-индикаторов для культуральных сред приведен в табл. 20.1.

Таблица 20.1. pH-Индикаторы для культуральных сред

Название	pK'	Диапазон pH и окраска ¹⁾	Обычно применяемая концентрация в среде ²⁾ , г/л	Количество 0,01 н NaOH, необходимое для растворения 0,1 г
Фениоловый красный	7,8	6,9(Ж)—8,5(К)	0,010—0,030	28,2
Бромтимоловый синий	7,1	6,1(Ж)—7,7(С)	0,010—0,032	16,0
Бромкрезоловый пурпурный	6,2	5,4(Ж)—7,0(П)	0,010—0,032	18,5
Хлорфеноловый красный	6,0	5,1(Ж)—6,7(К)	0,015	23,6
Бромкрезоловый зеленый	4,7	3,8(Ж)—5,4(С)	0,020	14,3

¹⁾ Обозначения. Ж — желтая, С — синяя, П — пурпурная, К — красная.

²⁾ Для добавления в культуральную среду растворяют в спирте или гоговят водный раствор, используя 0,01 н NaOH.

20.4.15. Суспензия гранул поли-β-гидроксibuтирата ([29]; см. также разд. 17.3.8)

Источником гранул первоначально служил штамм *Bacillus megaterium* КМ (штамм ATCC 13632), однако им могут быть и штаммы *Pseudomonas* spp., для которых характерно высокое содержание поли-β-гидроксibuтирата (ПГБ) (Palleroni, личное сообщение). Бактериальный штамм культивируют в условиях, способствующих образованию ПГБ. Для *B. megaterium* такие условия описаны Макрэ и Уилкинсоном [58], для псевдомонад — Сейниером и др. [88]. Когда уровень ПГБ становится достаточно высоким, что определяют по окрашиванию суданом черным (разд. 3.3.11), клетки собирают центрифугированием и суспендируют [в концентрации 15% (вес/объем)] в ледяном 0,02 М фосфатном буфере, pH 7,2 (разд. 20.4.16). Клетки разрушают ультразвуком (разд. 5.1.2) и центрифугируют при высокой скорости. Осадок суспендируют в щелочном гипохлоритном реактиве Уильямсона и Уилкинсона (разд. 20. 4.19) до плотности около 8 мг (сухого веса) на 1 мл [98]. Можно также использовать имеющийся в продаже 5%-ный гипохлорит, т. е. хлорную известь

(Palleroni, личное сообщение). Смесь инкубируют с перемешиванием при комнатной температуре в течение 2 дней. Суспензию оставляют для осаждения осадка и затем либо осторожно сливают и выбрасывают надосадочную жидкость, либо собирают гранулы центрифугированием. Гранулы суспендируют в воде и диализуют против водопроводной воды до удаления ионов хлора (тестируют на небольших порциях с помощью разбавленного раствора AgNO_3 до прекращения выпадения осадка AgCl). Затем проводят диализ против дистиллированной воды и несколько раз промывают гранулы ацетоном с помощью центрифугирования. Помещают гранулы в аппарат Сокслета и экстрагируют смесью ацетона и эфира (2 : 1, по объему) в течение трех дней для удаления липидов, отличных от ПГБ. Наконец, гранулы экстрагируют горячим диэтиловым эфиром, измельчают в порошок, сушат в вакууме и определяют сухой вес гранул.

После высушивания гранулы диспергируют в 0,02 М фосфатном буфере с помощью аппарата для измельчения тканей и ультразвукового генератора для получения стабильной концентрированной суспензии. Суспензию стерилизуют автоклавированием и хранят в холодильнике. Расчет количества концентрированной суспензии, которое необходимо добавить в расплавленный агар для получения конечной концентрации 0,25% (вес/объем) в верхнем слое, приведен в разд. 20.1.50.

20.4.16. Калий-фосфатный буфер

Готовят 0,2 М растворы 1) K_2HPO_4 и 2) KH_2PO_4 . Растворы смешивают в пропорциях, указанных в табл. 20.2, для получения нужного значения рН. Смесь (0,2 М фосфатный буфер) разбавляют в дальнейшем для получения нужной молярности. См. также разд. 6.1.2.

20.4.17. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ)

Основной раствор-10:

Na_2HPO_4 , безводный, химически чистый (reagent grade)	12,36 г
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, химически чистый (reagent grade)	1,80 г
NaCl , химически чистый (reagent grade)	85,00 г

Таблица 20.2. Количественные соотношения растворов K_2HPO_4 и KH_2PO_4 для получения калий-фосфатного буфера с различными pH

K_2HPO_4	KH_2PO_4	pH	K_2HPO_4	KH_2PO_4	pH
49	51	6,8	67	33	7,1
55	45	6,9	72	28	7,2
61	39	7,0	77	23	7,3

Компоненты растворяют в дистиллированной воде до конечного объема 1000 мл.

Стандартная смесь летучих жирных кислот
(~1 мэкв/100 мл):

Основной раствор	100 мл
Дистиллированная вода	900 мл

20.4.18. Стандартные растворы для газовой хроматографии [7]

Стандартная смесь летучих жирных кислот (~1 мэкв/100 мл):

Муравьиная кислота	0,037 мл
Уксусная кислота, ледяная	0,057 мл
Пропионовая кислота	0,075 мл
Изомасляная кислота	0,092 мл
Масляная кислота	0,091 мл
Изовалериановая кислота	0,109 мл
Валериановая кислота	0,109 мл
Изокапроновая кислота	0,126 мл
Капроновая кислота	0,126 мл
Гептановая кислота	0,142 мл
Дистиллированная вода	100 мл

При использовании стандартной смеси 1 мл раствора подкисляют и экстрагируют эфиром, применяемым для газовой хроматографии.

Стандартная смесь спиртов. Ниже указаны количества всех компонентов, которые необходимо добавить к 100 мл дистиллированной воды для получения конечной концентрации, указанной в скобках.

Этанол	0,1 мл	(1,7 мМ)
Пропанол	0,035 мл	(0,5 мМ)
Изобутанол	0,005 мл	(0,05 мМ)
Бутанол	0,01 мл	(0,1 мМ)
Изопентанол	0,005 мл	(0,05 мМ)
Пентанол	0,005 мл	(0,05 мМ)

1 мл смеси экстрагируют эфиром, применяемым для газовой хроматографии.

Стандартная смесь нелетучих кислот (~1 мэкв/100 мл):

Пировиноградная кислота	0,068 мл
Молочная кислота, 85%-ный сироп	0,84 мл
Щавелевоуксусная кислота	0,06 г
Щавелевая кислота	0,06 г
Метилмалоновая кислота	0,06 г
Малоновая кислота	0,06 г
Муравьиная кислота	0,06 г
Янтарная кислота	0,06 г
Дистиллированная вода	100 мл

1 мл смеси метилируют и экстрагируют хлороформом.

20.4.19. Гипохлоритный реактив Уильямсона и Уилкинсона [98]

200 г порошка хлорной извести мелко растирают с небольшим количеством дистиллированной воды и доводят объем до 1 л. Помешивая, добавляют 1 л 30%-ного (вес/объем) раствора Na_2CO_3 . Смесь оставляют на 2—3 ч, периодически помешивая. Затем ее фильтруют через бумагу, доводят рН фильтрата до 9,8 с помощью конц. HCl , подогревают до 37°C и удаляют осадок фильтрованием. Прозрачный фильтрат хранят в закупоренной бутылке в холодильнике. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев.

20.5. ЛИТЕРАТУРА

20.5.1. Общая литература

1. *Bodily H., Updyke E. L., Mason J. O. (ed.). Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections*, 5th ed., American Public Health Association, Inc., New York, 1970.

В книге описаны микроскопические, культуральные и биохимические методы идентификации патогенных организмов.

2. *Buchanan R. E., Gibbons N. E. (ed.). Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.

Книга представляет собой наиболее всестороннее и широко используемое таксономическое описание бактерий. Содержит подробные характеристики почти всех описанных видов, а также таблицы для дифференциации, ключи и иллюстрации.

3. *Cowan S. T., Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1974.
Пособие полезно не только для медиков-бактериологов, но и специалистов по общей бактериологии. Содержит обширную информацию по методам изучения, приготовлению сред, принципам классификации, идентификации и номенклатуры.
4. *Hardy R. W. F., Burns R. C., Holsten R. D.* Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation, *Soil Biol. Biochem.* 5, 47—81 (1973).
5. *Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C.* The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation, *Plant Physiol.*, 43, 1185—1207 (1968).
Эти две статьи содержат обширную практическую информацию по использованию метода восстановления ацетилена как в лабораторных, так и в полевых условиях. Подробно обсуждается хроматографический анализ этилена, а также различные факторы, влияющие на восстановление ацетилена.
6. *Hedén C., Illéni T. (ed.)*. New approaches to the identification of microorganisms, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
Описаны автоматизированные, а также электронно-вычислительные и микрометоды, связанные с характеристикой и идентификацией бактерий.
7. *Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C. (ed.)*. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
В книге содержатся таблицы для идентификации анаэробных бактерий, а также описаны методы их изучения и состав сред для выращивания. Подробно освещаются приготовление и использование предварительно восстановленных сред, а также способы культивирования.
8. *Holding A. J., Colee J. G.* Routine biochemical tests, p. 2—32. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 6A, Academic Press, Inc., New York, 1971.
Описаны принципы и методики осуществления большого числа тестов для получения биохимических характеристик бактерий.
9. *Holt J. G.* The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1977.
Руководство содержит все таблицы, описания родов и иллюстрации из полного „Определителя Берги“, однако в нем нет подробного описания видов. Предназначено специально для целей идентификации бактерий. [Имеется перевод: Дж. Хоулт (ред.). Краткий определитель бактерий Берги. — М.: Мир, 1980.]
10. *Lenette E. H., Balows A., Hausler W. J., Jr., Truant J. P. (ed.)*. Manual of clinical microbiology, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.
В книге описаны микроскопические, культуральные, биохимические и серологические методы идентификации патогенных микроорганизмов.
11. *Postgate J. R.* The acetylene reduction test for nitrogen fixation, p. 343—356. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in*

microbiology, vol 6B, Academic Press, Inc, New York, 1972

Краткий обзор принципов и методик выполнения анализов с восстановлением ацетилена для обнаружения нитрогеназной активности

12. *Skerman V B D* A guide to the identification of the genera of bacteria. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1967
Руководство составлено на основе VII издания „Определителя бактерий Берги”. Методический раздел содержит богатый материал по методам идентификации и приготовлению сред для различных видов бактерий
13. *Skerman V B D* Abstracts of microbiological methods, Wiley Interscience, New York, 1969
Книга освещает широкий набор физиологических и биохимических рутинных методов, почерпнутых из оригинальных статей

20.5.2. Специальная литература

14. *Adachi T, Murooka Y, Harada T*, J Bacteriol, **116**, 19—24 (1973)
15. *Adler J*, Science, **153**, 708—716 (1966)
16. *Aldridge K E, Gardner B B, Clark S J, Matsen J M*, J Clin Microbiol, **7**, 507—513 (1978)
17. *Back A E, Oberhofer T. R*, J. Clin Microbiol, **7**, 312—313 (1978)
18. *Balderston W L, Sherr B, Payne W J*, Appl Environ Microbiol, **31**, 504—508 (1976)
19. *Bernaerts M J, De Ley J*, Nature (London), **197**, 406—407 (1963)
20. *Board R G, Holding A J*, J Appl Bacteriol, **23**, xi (1960)
21. *Botsford J L, DeMoss R D*, J Bacteriol, **105**, 303—312 (1971)
22. *Burger H*, Zentralbl Bakteriол Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig, **202**, 97—109 (1967)
23. *Campbell N E R, Evans H J*, Can J Microbiol, **15**, 1342—1343 (1969)
24. *Cato E P, Moore W E C*, Can J Microbiol, **11**, 319—324 (1965)
25. *Christensen W B*, J Bacteriol, **52**, 461—466 (1946)
26. *Christensen W B*, Res Bull No 1, Weld County Health Department, Greeley, Colo (1949)
27. *Cohen Bazire G, Siström W R, Stanier R Y*, J Cell Comp Physiol, **49**, 25—68 (1957)
28. *Daesch G, Mortensen L E*, J Bacteriol, **110**, 103—109 (1972)
29. *DeLafield F P, Doudoroff M, Palleroni N J, Lusty C J, Con-topoulos R*, J Bacteriol, **90**, 1455—1466 (1965)
30. *Dobereiner J, Day J M* In W E Newton and C J Nymans (ed), Symposium of nitrogen fixation, p 518—538 Washington State University, Pullman, 1976
31. *Dowda H*, J Clin Microbiol, **6**, 605—609 (1977)
32. *Elder B L, Trujillo I, Blasevic D J*, J Clin Microbiol, **6**, 312—313 (1977)
33. *Evans J B, Niven C F*, J Bacteriol, **59**, 545—550 (1950).

- 34 *Ewing W H, Davis B R, Reavis R W*, Public Health Lab, **15**, 153 (1957)
- 35 *Finegold S M, Martin W J, Scott E G* Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 5th ed, C V Mosby, St Louis, 1978
- 36 *Fung D Y C, Hartman P A*, Can J Microbiol, **18**, 1623—1627 (1972)
- 37 *Fung D Y C, Hartman P A* In C G Heden and Illén T (ed), New approaches to the identification of microorganisms, p 385—392, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1975
- 38 *Fung D Y C, Miller R D*, Appl Microbiol, **20**, 527—528 (1970)
- 39 *Gallien R* In C G Heden and Illén T (ed), New approaches to the identification of microorganisms, p 385—392, John Wiley and Sons, Inc, New York, 1975
- 40 *Gulhertz L S, Okuluk R L*, Appl Environ Microbiol, **35**, 109—112 (1978)
- 41 *Hansen S L, Hardesty D R, Meyers B M*, Appl Microbiol, **28**, 798—801 (1974)
- 42 *Haynes W C*, J Gen Microbiol, **5**, 939—950 (1951)
- 43 *Hino S, Wilson P W*, J Bacteriol, **75**, 403—408 (1958)
- 44 *Hugh R, Leifson E*, J Bacteriol, **66**, 22—26 (1953)
- 45 *Hungate R E* The rumen and its microbes, Academic Press Inc, New York, 1966
- 46 *Hwang M, Ederer G M*, J Clin Microbiol, **1**, 114—115 (1975)
- 47 *Hylemon P B, Wells J S, Krieg N R, Jannasch H W*, Int J Syst Bacteriol, **23**, 340—380 (1973)
- 48 *Isenberg H D, Sampson-Scherer J*, J Clin Microbiol, **5**, 336—340 (1977)
- 49 *Kiehn T E, Brennan K, Ellner P D*, Appl Microbiol, **28**, 668—671 (1974)
- 50 *Killinger A H* In E H. Lennette, E H Spaulding, and J P Truant (ed), Manual of clinical microbiology, 2nd ed, p 135—139 American Society for Microbiology, Washington, D C, 1974
- 51 *King E O, Ward M K, Raney D E*, J Lab Clin Med, **44**, 301—307 (1954).
- 52 *Kohn J*, J Clin Microbiol, **6**, 249 (1953)
- 53 *Law J H, Slepecky R A*, J Bacteriol, **82**, 33—36 (1961)
- 54 *Lederberg J, Lederberg E M*, J Bacteriol, **63**, 399—406 (1962)
- 55 *Leifson E*, J Bacteriol, **85**, 1183—1184 (1963)
- 56 *Le Minor L, Ben Hamda F*, Ann Inst Pasteur (Paris), **102**, 267—277 (1962)
- 57 *Lovelace T E, Colwell R R*, Appl Microbiol, **16**, 944—945 (1968)
- 58 *Macrae R M, Wilkinson J F*, J Gen Microbiol, **19**, 210—222 (1958)
- 59 *McIlroy G T, Yu P K W, Martin W J, Washington II J A*, Appl Microbiol, **24**, 358—362 (1972)
- 60 *Milazzo F H, Fitzgerald J W*, Can J Microbiol, **13**, 659—664 (1967)
- 61 *Møller V*, Acta Pathol Microbiol Scand, **36**, 158—172 (1955)
- 62 *Moore H B, Sutter V L, Finegold S M*, J Clin Microbiol, **1**, 15—24 (1975)

63. *Morton H. E., Monaco M. A. J.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**, 64—66 (1971).
64. *Moussa R. S.* In: *C. G. Hedén and T. Illéni (ed.)*, *New approaches to the identification of bacteria*, p. 407—420, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
65. *Neal J. L., Jr., Lu K. C., Bollen W. B., Trappe J. M.*, *Appl. Microbiol.*, **14**, 695—696 (1966).
66. *Neyra C. A., Döbereiner J., LaLande R., Knowles R.*, *Can. J. Microbiol.*, **23**, 300—305 (1977).
67. *Niven C. F., Jr., Smiley K. L., Sherman J. M.*, *J. Bacteriol.*, **43**, 651—660 (1972).
68. *Nord C. E., Lindberg A. S., Dahlback A.*, *Med. Microbiol. Immunol.*, **159**, 211—220 (1974).
69. *Nord C. E., Wadstrom T., Dahlback A.* In: *C. G. Hedén and T. Illéni (ed.)*, *New approaches to the identification of microorganisms*, p. 393—406, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
70. *Nord C. E., Wretling B., Dahlback A.*, *Med. Microbiol. Immunol.*, **163**, 93—97 (1977).
71. *Oberhofer T. R., Rowen J. W., Cunningham G. F., Higbee J. W.*, *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 559—566 (1977).
72. *Okon Y., Albrecht S. L., Burris R. H.*, *J. Bacteriol.*, **128**, 592—597 (1976).
73. *Page W. J., Sadoff H. L.*, *J. Bacteriol.*, **125**, 1080—1087 (1976).
74. *Pelczar M. J., Jr. (ed.)*, *Manual of microbiological methods*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1957.
75. *Porschen R. K., Sonntag S.*, *Appl. Microbiol.*, **27**, 1031—1033 (1974).
76. *Robertson E. A., Macks G. C., MacLowry J. D.*, *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 421—424 (1976).
77. *Rosenberg H., Ennor A. H., Morrison V. F.*, *Biochem. J.*, **63**, 153—159 (1956).
78. *Rutherford I., Moody V., Gavan T. L., Ayers L. W., Taylor D. L.*, *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 458—464 (1977).
79. *Schreier J. B.*, *Am. J. Clin. Pathol.*, **51**, 711—716 (1969).
80. *Shayegani M., Lee A. M., McGlynn D. M.*, *J. Clin. Microbiol.*, **7**, 533—538 (1978).
81. *Shayegani M., Maupin P. S., McGlynn D. M.*, *J. Clin. Microbiol.*, **7**, 539—545 (1978).
82. *Shinoda S., Okamoto K.*, *J. Bacteriol.*, **129**, 1266—1271 (1977).
83. *Sierra G., Antonie van Leeuwenhoek*, *J. Microbiol. Serol.*, **23**, 15—22 (1957).
84. *Simmons J. S.*, *J. Infect. Dis.*, **39**, 201—214 (1926).
85. *Smith P. B., Hancock G. A., Rhoden D. L.*, *Appl. Microbiol.*, **18**, 991—993 (1969).
86. *Smith P. B., Tomfohrde K. M., Rhoden D. L., Balows A.*, *Appl. Microbiol.*, **22**, 928—929 (1971).
87. *Smith R. F., Rogers R. R., Bettge C. L.*, *Appl. Microbiol.*, **23**, 423—424 (1972).
88. *Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M.*, *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 159—271 (1966).
89. *Stargel M. D., Thompson F. S., Phillips S. E., Lombard G. L., Dowell V. R., Jr.*, *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 291—301 (1976).

90. *Stockdale H., Ribbons D. W., Dawes E. A.*, J. Bacteriol., **95**, 1798—1803 (1968).
91. *Thornley M. J.*, J. Appl. Bacteriol., **23**, 37—52 (1960).
92. *Tomfahnde K. M., Rhoden D. L., Smith P. B., Balows A.*, Appl. Microbiol., **25**, 301—304 (1973).
93. *Wheater D. M.*, J. Gen. Microbiol., **12**, 123—132 (1955).
94. *Whittenbury R.*, J. Gen. Microbiol., **35**, 13—26 (1964).
95. *Wilkins T. D., Walker C. B.*, Appl. Microbiol., **30**, 825—830 (1975).
96. *Wilkins T. D., Walker C. B., Moore W. E. C.*, Appl. Microbiol., **30**, 831—837 (1975).
97. *Williams M. A.*, Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon, **10**, 193—196 (1960).
98. *Williamson D. H., Wilkinson J. F.*, J. Gen. Microbiol., **19**, 198—209 (1958).
99. *Yoch D. C., Pengra R. M.*, J. Bacteriol., **92**, 618—622 (1966).
100. *Zobell C. E.* Marine microbiology, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., 1946.

НУМЕРИЧЕСКАЯ ТАКСОНОМИЯ

Р. Колуэлл, Б. Остин

Принципы нумерической таксономии достаточно четко сформулированы. С тех пор как в 1957 г. [12] стала очевидной доступность применения в этой области электронно-вычислительных машин, вышло несколько сотен публикаций, посвященных применению методов нумерической таксономии для классификации и идентификации бактерий. Пригодность нумерических методов подтверждается на большом количестве таксонов, которые были установлены или уточнены в рамках ее подходов. Согласно этим принципам, основанным на адансоновской таксономии [6], необходимо достижение максимального информационного содержания, связанного с таксонами, чему способствует сопоставление штаммов по максимально возможному числу признаков, придание различным признакам равного веса и установление таксонов на основании их общего сходства в соответствии с результатами фенетического анализа (т. е. анализа, основанного на наблюдаемых признаках организмов, а не на предполагаемом происхождении последних). В конце данной главы дается список общей литературы для читателей, желающих подробнее ознакомиться с концепциями и методами нумерической таксономии [1—5].

Многие исследователи неохотно принимают концепцию равного веса разных признаков. Хотя и можно обосновать, что одни признаки более важны, чем другие, реально, при современном состоянии знаний, нельзя объективно оценить значимость каждого признака. Нумерическая таксономия позволяет устанавливать однородные таксоны. На основе же обобщенной характеристики таксонов возможна апостериорная оценка признаков, позволяющая отобрать те из них, которые оказываются наиболее полезными для идентификацион-

ных таблиц. Такие таблицы являются политетными, т. е. отражают следующее положение: хотя набор признаков, используемых для идентификации данного таксона, является характерным для него, любой из признаков набора не обязательно должен быть выражен у каждого представителя данного таксона.

Изучение бактерий с помощью методов нумерической таксономии включает 5 существенно необходимых этапов: 1) отбор штаммов, 2) выбор тестов, 3) кодирование и представление результатов тестирования в удобной для компьютерного анализа форме, 4) компьютерный анализ взаимосвязей между штаммами и выявление кластеров, 5) представление и интерпретация результатов. Для компьютерного анализа можно использовать ряд коэффициентов, которые были рассчитаны применительно к микробиологическим задачам [4, 5, 7].

21.1. ОТБОР ШТАММОВ

При наличии соответствующих компьютерных программ и достаточных ресурсов, нумерические методы позволяют анализировать данные, полученные для большого числа штаммов бактерий. Обычно в одном цикле анализа может быть изучено более 300 штаммов. Большой объем данных можно разделить на части, но общее сравнение возможно лишь с помощью подробного анализа внутри- и межгруппового сходства. Чтобы облегчить работу с большим объемом данных, вводят концепцию гипотетического среднего организма [11]. В таком случае появляется возможность сравнивать результаты, получаемые для серий в тысячу или более штаммов.

Правил, устанавливающих пределы разнообразия штаммов, изучаемых с помощью нумерической таксономии, не существует. Отбор штаммов может быть легкой или утомительной процедурой в зависимости от того, представляют ли штаммы один вид бактерий, несколько видов одного рода или несколько родов. Набор штаммов может включать культуры, представляющие исторический интерес, важные с точки зрения патологии или имеющие большое значение для окружающей среды.

Данный набор должен включать также штаммы, уже идентифицированные и имеющие название; в тех случаях, когда это возможно, среди известных штаммов должны быть аутентичные « типовые » (постоянно поддерживаемые штаммы-образцы таксонов), а также дополнительные « референтные » штаммы, идентичность которых установлена для сравнительных целей. Типовые и референтные штаммы можно получить из коллекций культур, например из Американской коллекции типовых культур (Rockville, Md.) или Национальной коллекции типовых культур (London, England). Полезно проводить сравнение с двумя штаммами каждого вида. При этом исключается возможность случайного заражения, ошибок в обозначениях или утраты жизнеспособности штаммов. При исследовании взаимоотношений между штаммами внутри вида, рода или семейства в набор штаммов следует включать типовые и референтные для всех рассматриваемых подвидов, родов и семейств.

Прежде чем проводить всестороннее таксономическое изучение, необходимо обеспечить выделение и хранение чистых культур. Методы получения чистых культур описаны в гл. 8, а методы хранения культур в гл. 12.

21.2. ВЫБОР ТЕСТОВ

Выбор тестов для получения обобщенной характеристики бактерий является неотъемлемой частью таксономических исследований. Необходимо выбрать такие рутинные тесты, в которых охватывался бы широкий спектр биологических активностей микроорганизма и учитывались бы морфологические, колониальные, биохимические и физиологические признаки, а также потребности в питании (разд. 20.1). Можно использовать и специальные тесты, например определение серологических и экологических характеристик (разд. 20.2). В набор тестов для обработки методами нумерической таксономии может быть включен любой тест, позволяющий получить приемлемую количественную и качественную информацию об изучаемом штамме. Не следует заранее сравнивать результаты тестов по их относительной значимости, это противоречит основным принципам нумерической таксономии. Некоторые тесты, нередко

используемые в рамках традиционных подходов, при перенесении в сферу нумерической таксономии становятся источником ошибок. Например, следует избегать применения теста на оксидазу, реакции Фогеса — Проскауера и теста на гидролиз желатины ввиду их плохой воспроизводимости [13—15].

Во всех таксономических исследованиях следует учитывать возможность ошибки, связанной с тестированием, и, как бы ни подходил тот или иной тест в конкретном случае, от него следует отказаться, если он характеризуется плохой воспроизводимостью или часто приводит к ошибкам в интерпретации результатов. Если число «ненадежных» тестов составляет лишь небольшую часть общего числа тестов, используемых для нумерического анализа, то общий результат можно считать надежным, т. е. статистически достоверным. Чем большее число признаков включено в анализ, тем более точным будет общее представление о фенотипе организма. Если тестов слишком мало (например, менее 40), результаты могут быть статистически недостоверными. Принято считать, что оптимальное количество признаков для нумерической таксономии — от 100 до 200. Такое количество можно с успехом тестировать в большинстве лабораторий, особенно при наличии отработанных методов ускоренного получения и учета результатов, например, с помощью многоточечной инокуляции в лунки или на пластинки агара (разд. 20.2.4) и перепечатаывания колоний с чашки на чашку (разд. 20.2.5).

Выбор тестов для анализа полностью зависит от исследователя. Более предпочтительными являются тесты, предназначенные для получения информации о единичном свойстве, т. е. об элементарном признаке. *Элементарным признаком* называется таксономическая характеристика двух или нескольких состояний, которая является логически неделимой, если только не меняется метод кодирования [5, 16]. В нумерической таксономии основными источниками информации для классификации и идентификации являются фенотипические признаки, генетические же признаки (гл. 22) в рамках указанного подхода обычно не используются.

Составляя набор данных, не рекомендуется использовать тесты, в которых учитываются избыточные при-

знаки или признаки, присущие или несвойственные одновременно всем штаммам данного набора (они не дают полезной дискриминирующей информации). В каждый набор штаммов следует включать типовые или референтные штаммы, для которых результаты теста заранее известны, что позволяет контролировать пригодность используемых сред и методов. При тестировании следует использовать также инокулированные контрольные пробы, которые могут помочь обнаружить случайное заражение. Такие контрольные пробы повышают точность результатов.

Обработку всех штаммов одной серии следует по возможности стандартизировать. Например, если один штамм из набора пуждается в добавлении к среде 0,5% (вес/объем) хлорида натрия, среды для всех штаммов данного набора должны иметь такую же концентрацию этой соли, если только она не подавляет рост какого-либо штамма.

Процедуры инокулирования и инкубации также следует стандартизировать. Петли для инокуляции должны иметь одинаковый диаметр, пастеровские пипетки для посева культур также должны быть одинаковыми, чтобы наносить капли равного объема. Следует использовать культуры, взятые в фазе экспоненциального роста. Время инкубации определяется скоростью роста изучаемого штамма. Медленно растущие штаммы следует инкубировать достаточно долго, в противном случае результат теста может быть ошибочно интерпретирован как отрицательный. Обычно результаты учитывают и регистрируют через 1, 2, 3, 7, 14, 21 и 28 суток после посева. При этом естественно обеспечивается оптимальная для изучаемых штаммов температура инкубации.

21.3. КОДИРОВАНИЕ ДАННЫХ

Необходимо своевременно и непрерывно регистрировать проведение тестов и их результаты. Отдельные странички с наспех набросанными заметками чаще всего теряются, а записи на них не поддаются расшифровке. Лучше всего вести регистрацию в специальных журналах с разграфленными на 80 колонок страницами, которые обычно используют в книгохранилищах или

вычислительных центрах; такая форма регистрации удобна для переноса таксономических данных на перфокарты или ленты. Стандартная карта IBM содержит 80 пронумерованных колонок; единственное, что может ограничить ее использование, — это размер страниц с зарегистрированными результатами. Форма и размер этих страниц должны быть приемлемыми для компьютера и удовлетворять требованиям всего исследования.

Наконец, все результаты, полученные для данного набора штаммов, преобразуют в числовую форму. В нумерической таксономии используется 3 основных типа числовых кодов. Самым простым является двоичный код для элементарных признаков, когда положительная реакция (плюс) кодируется как 1, а отрицательная (минус) — как 0. Обычно указывается, какие из признаков не поддаются сравнению (НС) (например, если один из изучаемых штаммов не может расти на среде, используемой для определения способности образовывать H_2S). В разных компьютерах и разными специалистами для обозначения этого понятия используются различные коды. Так, например, результаты теста могут быть обозначены знаками «плюс», «минус» и «НС» или, в числовой форме, соответственно 1, 0 и 3.

Другой метод кодирования используется для количественно определяемых признаков, отражающих активность реакции или глубину превращения (например, интенсивное или слабое образование кислот из глюкозы или других углеводов, сильная или слабая реакция на

Таблица 21.1. Пример представления результатов учета количественно определяемых признаков для их дальнейшего преобразования в числовую форму

№ штамма	Признаки		
	слабая чувствительность к пенициллину	средняя чувствительность к пенициллину	сильная чувствительность к пенициллину
14	—	НС ¹⁾	НС
15	+	—	—
16	+	+	—
17	+	НС	+

¹⁾ НС — не сравнивается

оксидазу). Пример записи таких данных, которые в дальнейшем преобразуют в числовую форму, приводится в табл. 21.1.

Третий тип кодирования относится к качественно определяемым признакам, таким, как пигментация, окраска по Граму или форма клеток [3].

Данные, закодированные в числовой форме, готовы для переноса на перфокарты. Составленную перфокарту необходимо проверить, так как даже самый опытный оператор может допустить ошибки. После проверки данные готовы для компьютерного анализа.

21.4. ОБРАБОТКА ДАННЫХ НА ЭВМ

Нумерическая таксономия требует проведения многочисленных расчетов на основе имеющихся данных, что может стоить немалых усилий, если изучается большое количество штаммов. Таким образом, расходы на обработку данных с помощью вычислительной техники могут быть значительными. Общее количество арифметических расчетов (N), необходимых для изучаемого набора штаммов, можно определить по формуле

$$N = \frac{1}{2}n(n-1),$$

где n — общее число штаммов в наборе. Например, для сравнения результатов по 100 штаммам необходимо провести 4950 арифметических расчетов. С линейным увеличением числа штаммов число расчетов увеличивается экспоненциально.

Компьютер производит логическую последовательную обработку данных, включая оценку общего сходства между штаммами и иерархическое распределение штаммов на основе степени их сходства. Существует много программ, предназначенных для кластерного анализа. Такие программы предложены, в частности проф. Снисом (Peter Sneath, University of Leicester, Leicester, England), проф. Колуэлл (Rita R. Colwell, University of Maryland, College Park, Md.), проф. Рольфом (James Rohlf, State University of New York, Stony Brook, N. Y.) и проф. Кровелло (Teodore Crovello, University of Notre Dame, Notre Dame, Ind.). Используя любую из имеющихся программ, после нескольких крат-

ких уроков исследование в области нумерической таксономии сможет провести даже начинающий таксономист. На ранних этапах исследования данные вводят на файлы компьютера. Эти файлы могут быть вызваны из удаленных терминалов для внесения дополнений и корректив. На основе полученных данных вычисляют степень сходства каждого из штаммов по отношению ко всем членам множества; любой из членов этого множества принято называть операционной таксономической единицей (ОТЕ).

При проведении анализа пользуются коэффициентом сходства. Имеется большой выбор таких коэффициентов [1, 5, 7, 8], однако в нумерической таксономии бактерий наиболее широко используются два из них. Простой коэффициент соответствия (S_{SM}) определяется [14] уравнением

$$S_{SM} = \frac{a + c}{a + b + c}.$$

Коэффициент Жаккарда (S_J) [10] определяется так:

$$S_J = \frac{a}{a + b},$$

где a и c — количество положительных и отрицательных совпадающих результатов соответственно, а b — число несовпадающих результатов, выявленных при сопоставлениях различных ОТЕ. При использовании коэффициента S_{SM} рассматривается общее соответствие сопоставляемых штаммов, включая соответствие как по числу общих признаков со знаком плюс, так и по числу общих признаков со знаком минус; поэтому данный коэффициент является мерой общего сходства. При использовании коэффициента S_J совпадающие признаки со знаком минус в расчет не принимаются. Хотя достоинства каждого из этих уравнений подробно обсуждаются в ряде работ [4, 5], необходимо подчеркнуть, что коэффициент S_{SM} может отражать наличие большого числа отрицательных совпадающих признаков, создавая, таким образом, ошибочное впечатление об однородности массива. Это может вызывать трудности в исследованиях многокомпонентных сообществ бактерий, подобных встречающимся в природе [9]. На практике данные

обычно анализируют, используя как коэффициент S_{sm} , так и коэффициент S_L .

В результате анализов, проводимых в исследованиях по нумерической таксономии, составляют матрицы сходства, содержащие информацию о связях между штаммами. На основе результатов вычисления сходства можно провести кластерный анализ с целью распределения штаммов в иерархическом порядке в соответствии со степенью общего сходства. Для кластерного анализа подсчитывают индексы сходства во всех возможных парах ОТЕ в пределах объема полученных данных. С помощью простого метода односторонней связи матрицу данных сканируют для определения пары организмов с наибольшей степенью сходства (S) [10]. Затем матрицу вновь сканируют с целью выявления пар ОТЕ со следующими по величинам значениями S . Такой парой могут быть организмы, примыкающие к начинающему вырисовываться кластеру. Если один из штаммов, входящих в пару, уже был отнесен к существующему кластеру, то другой также можно отнести к последнему. Матрицу данных сканируют с помощью компьютера до тех пор, пока все штаммы не будут перенесены в соответствующие кластеры. Таким образом штаммы распределяют в иерархическом порядке и составляют матрицы сходства и дендрограммы (см. ниже).

21.5. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При первом просмотре распечатки результатов исследования в области нумерической таксономии можно составить большой треугольник из чисел обычно с точностью до третьего знака. На рис. 21.1, А изображена рассортированная матрица сходства, отражающая результаты сравнения штаммов. Умноженные на 100 указанные числа дают процент сходства между штаммами. Представление данных в виде треугольника точно отражает связь между штаммами, однако оно не совсем удобно. Более наглядной формой представления результатов является диаграмма матрицы сходства с использованием различной штриховки (рис. 21.1. Б). На этой диаграмме степени сходства представлены в нескольких

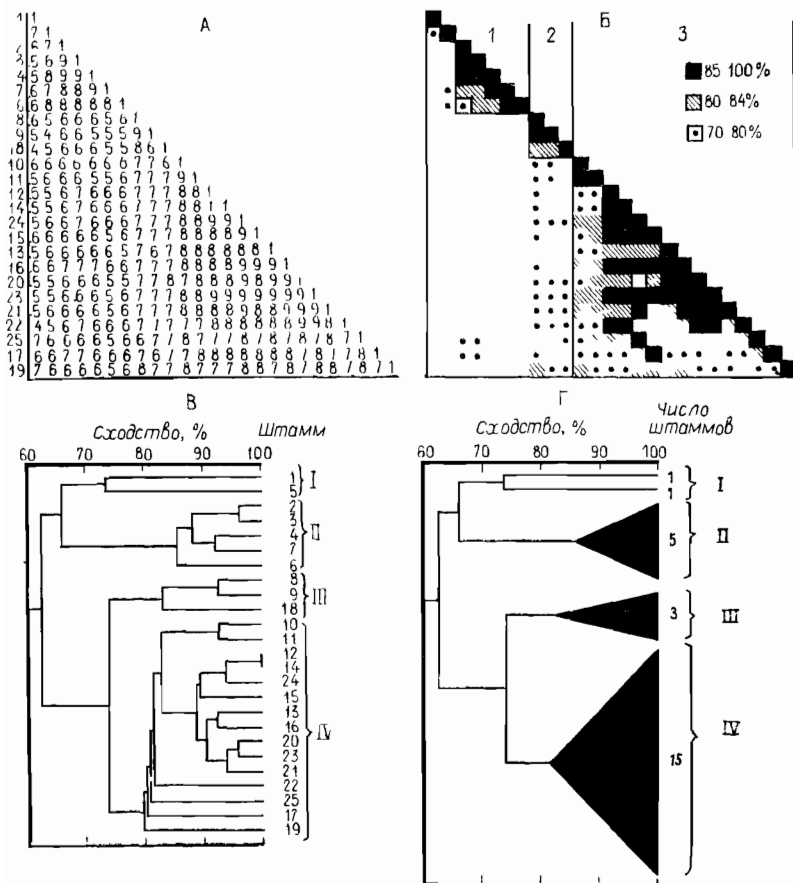


Рис. 21.1. Изображение результатов численно-таксономического изучения бактерий с расчетом рассортированной матрицы сходства (А); для удобства числа округлены до одного знака после запятой. На основе этой информации можно составить диаграмму со штриховкой (Б), дендрограмму (В) и упрощенную дендрограмму (Г), I — грамотрицательная палочка, II — *Pseudomonas* spp., кластер 1, III — *Lucibacterium* spp, кластер 2, IV — *Vibrio parahaemolyticus*, кластер 3.

интервалах (например, 90—100%, 85—89% и т. д.), которым соответствуют по-разному заштрихованные участки. Здесь более наглядно видны связи между

штаммами. Участки диаграммы, соответствующие наибольшим значениям S , закрашены черной краской. Пример, приведенный на рис. 21.1, Б, иллюстрирует отношения в ряду грамотрицательных оксидазоположительных бактерий, выделенных из садков для выращивания моллюсков. На диаграмме ясно видно, что трем выделенным группам штаммов соответствуют *Pseudomonas* spp., *Lucibacterium* spp. и *Vibrio parahaemolyticus*.

Наряду с рассортированными матрицами сходства с помощью компьютера можно получать и дендрограммы (рис. 21.1, Б, Г). Дендрограмму, или разветвленную диаграмму, изображенную на рис. 21.1, В, обычно составляют, связывая пару или группу организмов наивысшими значениями S . Упрощенная диаграмма (рис. 21.1, Г) иллюстрирует взаимосвязь между группами штаммов и отражает результат анализа очень большого набора данных. Дендрограммы, составленные на основе результатов анализа фенетических данных, не обязательно отражают филогенетические связи между организмами (т. е. связи, основанные на происхождении), и поэтому их нельзя рассматривать в таком качестве без специальных молекулярно-генетических доказательств, которые получают в процессе многоплановых таксономических исследований [10].

Кластеры выделяют на основе общего сходства. По рассортированным матрицам сходства и дендрограммам (рис. 21.1, Б) выделяют кластеры сходных штаммов и оценивают сходство между кластерами. Группы штаммов можно охарактеризовать далее, составив таблицу частоты встречаемости каждого признака среди членов группы. Так, можно составить идентификационные таблицы на основе отобранных дискриминирующих признаков для всех групп с целью последующей диагностики вновь выделенных изолятов. Можно вычислить средний, наиболее типичный для каждой группы микроорганизм. Этот гипотетический средний организм (ГСО) обладает признаками, представленными по крайней мере у 50% членов группы [11]. Члены однородных групп характеризуются более высокими значениями S , чем ГСО. Штаммы, имеющие лишь частичное сходство с несколькими членами группы, можно исключить из нее или изучить их более подробно, чтобы точно установить

взаимосвязи с данной группой. Кластеры можно идентифицировать и дать им название, если в число исследуемых организмов включены типовые или референтные штаммы или если проведено сравнение признаков кластера с признаками, указанными в диагностических ключах в таблицах. В некоторых случаях кластеры, выявленные с помощью нумерической таксономии, не удаётся отождествить с существующими известными таксонами, что отражает ограниченность традиционных подходов в таксономии и указывает на потенциальную неадекватность существующих диагностических процедур. Не исключено, что такими кластерами могут оказаться новые, ранее не описанные таксоны.

После того как анализ группы штаммов закончен, результаты исследования в области нумерической таксономии можно объединить с данными, полученными в других работах по нумерической таксономии, что позволяет создавать банк таксономических данных.

21.6. ЛИТЕРАТУРА

21.6.1. Общая литература

1. *Clifford H. T., Stephenson W.* An introduction to numerical classification, Academic Press, Inc., New York, 1975.
2. *Colwell R. R.* Numerical analysis in microbial identification and classification, *Dev. Ind. Microbiol.*, **11**, 154—160 (1970).
3. *Lockhart W. R., Liston J. (ed.)*. Methods for numerical taxonomy, American Society for Microbiology, Bethesda, Md., 1970.
4. *Sneath P. H. A., Sokal R. R.* Numerical taxonomy, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1973.
5. *Sokal R. R., Sneath P. H. A.* Principles of numerical taxonomy, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1963.

Указанные работы посвящены теоретическим и практическим аспектам нумерической таксономии и представляют интерес как для начинающих, так и для опытных таксономистов. Подробно рассматриваются вопросы об источниках данных, разновидностях фенотипических признаков, вопросы обработки данных, методов компьютерного анализа и интерпретации данных.

21.6.2. Специальная литература

6. *Andanson M.* Familles de plantes, vol. 1, Vincent, Paris, 1763.
7. *Austin B., Colwell R. R.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 204—210 (1977).
8. *Cheetham A. H., Hazel J. E.*, *J. Paleontol.*, **43**, 1130—1136 (1969).
9. *Colwell R. R.*, *J. Bacteriol.*, **104**, 410—433 (1970).

10. *Goodfellow M., Austin B., Dawson D.* In: C. H. Dickinson and T. F. Preece (ed.), *Microbiology of aerial plant surfaces*, p. 277—292, Academic Press, London, 1976.
11. *Liston J., Wiebe W. J., Colwell R. R.*, *J. Bacteriol.*, **85**, 1061—1071 (1963).
12. *Sneath P. H. A.*, *J. Gen. Microbiol.*, **17**, 201—226 (1957).
13. *Sneath P. H. A.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**, 508—523 (1974).
14. *Sneath P. H. A., Collins V. G.*, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **40**, 481—527 (1974).
15. *Sneath P. H. A., Johnson R.*, *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 377—392 (1972).
16. *Sokal R. R., Michener C. D.*, *Univ. Kans. Sci. Bull.*, **38**, 1409—1438 (1958).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Дж. Джонсон

Выяснение структуры и физических свойств ДНК и РНК дало возможность исследователям определять таксономические связи между бактериями путем сравнения их геномов. Грубо геномы можно сравнивать между собой по общему *составу оснований ДНК*: общее число пар гуанина и цитозина ($G+C$, мол. %) в ДНК является постоянной характеристикой данного организма. Если значения $G+C$ для ДНК двух организмов значительно различаются, это свидетельствует о том, что между ними нет близкого генетического сходства. Однако близкие значения $G+C$ не обязательно означают, что сравниваемые организмы имеют сходные последовательности нуклеотидов в ДНК. Для такого вывода требуется сравнить геномы значительно более тонким методом, чем определение состава оснований ДНК, а именно путем определения степени гомологии нуклеиновых кислот. Изучение гомологии позволяет сравнивать организмы в отношении линейной последовательности нуклеотидов вдоль 1) всей цепи ДНК (гомология ДНК) или 2) вдоль тех участков ДНК, которые кодируют определенные типы РНК (гомология РНК).

Степень гомологии различных ДНК является средним показателем сходства геномов сравниваемых организмов. Каждый тип РНК характеризуется своей степенью гомологии. Степень гомологии мРНК близка к степени гомологии ДНК (по крайней мере у бактерий), поскольку для транскрипции молекул мРНК используется большая часть генома. Напротив, рибосомная РНК (рРНК) и транспортная РНК (тРНК) кодируются лишь небольшой частью генома, поэтому в опытах по определению гомологии с использованием этих двух типов РНК можно сравнивать лишь небольшие участки геномов. Во всех группах бактерий, которые были достаточно хорошо изучены, рРНК- и тРНК-цистроны ДНК, по-видимому, эволюционировали медленнее, чем

основная масса цистронов. Поэтому методы, основанные на определении гомологии ДНК, применяются для выявления сходства между близкими организмами, тогда как определение гомологии рРНК позволяет выявить сходство между более далекими друг от друга организмами. В конце этой главы (разд. 22.8.1) приведен список литературы общего характера [1—6], касающейся принципов и специфики методов определения генетического родства организмов на основании изучения гомологии нуклеиновых кислот.

Методы определения гомологии ДНК и РНК не включают в себе трудностей ни в теоретическом, ни в практическом отношении, если для их осуществления подготовлен нужный материал. Технические трудности связаны с выделением ДНК и РНК и введением в них радиоактивной метки. Каждая группа микроорганизмов имеет в этом отношении свои особенности, поэтому универсальных рекомендаций не существует.

В настоящей главе описываются главным образом те методы, которые успешно зарекомендовали себя в моей лаборатории. Методы выделения и характеристики плазмидных ДНК рассмотрены в гл. 15.

22.1. РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Первый этап при выделении нуклеиновых кислот — это разрушение бактериальных клеток. В зависимости от природы клеточной стенки бактерии могут быть разрушены 1) с помощью одного лишь детергента, 2) с использованием сочетания действия детергентов и гидролитических ферментов или 3) с помощью физических методов, таких, как разрушение под действием ультразвука, в результате резкого изменения давления или при встряхивании со стеклянными шариками.

Грамотрицательные бактерии часто лизируются под действием одного лишь детергента, хотя имеется много исключений. В отличие от них почти все грамположительные бактерии приходится сначала обрабатывать лизоцимом (гидролитическим ферментом, действующим на пептидогликан клеточной стенки), а затем уже при-

менять детергент. Поэтому методы разрушения клеток для этих двух групп бактерий рассмотрены здесь отдельно.

22.1.1. Грамотрицательные бактерии

Клетки из культуры, находящейся в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазе роста, центрифугируют и ресуспендируют их в солевом буфере с ЭДТА (0,15 М NaCl, 0,01 М Na-ЭДТА, pH 8,0) в объеме, составляющем от $1/10$ до $1/40$ объема исходной культуры. Добавляют додецилсульфат натрия (ДСН) в виде 20%-ного (вес/объем) раствора до конечной концентрации 1%. Для ускорения лизиса колбу помещают в водяную баню при 50—60°C и встряхивают. О начале лизиса свидетельствует быстрое увеличение вязкости и появляющаяся опалесценция.

Если бактерии плохо лизируются в этих условиях, то можно применять другие методики. Например, 1) используют более разбавленную клеточную суспензию; 2) клетки собирают в экспоненциальной фазе роста культуры, так как быстро растущие клетки более подвержены лизису; 3) добавляют лизоцим (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), проназу (Calbiochem-Behring, La Jolla, Calif.) или протейназу К (E. M. Laboratories, Inc., Elmsferd, N.Y.) к суспензии клеток в солевом буфере с ЭДТА и перед добавлением ДСН инкубируют при 37°C. Во время инкубации периодически отбирают пробы для проверки на лизис под действием ДСН. В случае использования лизоцима клетки суспендируют в солевом буфере с ЭДТА, разбавленном в соотношении 1:5, так как растворы с большой ионной силой ингибируют действие фермента. Периодически отбираемые пробы испытывают на лизис под действием ДСН. Перед добавлением ДСН ионную силу буфера в основной клеточной суспензии восстанавливают до исходной.

Для разрушения клеток грамотрицательных бактерий, которые не лизируются с помощью описанных выше методов, основанных на применении детергентов, используют один из многочисленных физических методов. Палочковидные бактерии средней длины можно разру-

шить путем пропускания суспензии клеток через пресс Френча (American Instrument Co., Silver Springs, Md.) под давлением $84 \cdot 10^6$ — $112 \cdot 10^6$ Па; для разрушения более коротких палочек или кокков может потребоваться более высокое давление, а именно $21 \cdot 10^7$ — $23 \cdot 10^7$ Па. Дополнительную информацию см. в разд. 5.1.1 и 18.1.3. Ультразвуковые дезинтеграторы обычно менее эффективны для разрушения клеток, чем пресс Френча; дополнительные сведения по ультразвуковой дезинтеграции содержатся в разд. 5.1.2 и 18.1.3. Для микроорганизмов, которые нельзя разрушить этими методами, обычно применяют клеточный гомогенизатор фирмы Бронвилл (Bronwill Stientific Co., Rochester, N. Y.). Гомогенизатор включают на 4000 об/мин, используя равные объемы клеточной суспензии и стеклянных шариков (у Bronwill Stientific Co. можно приобрести стеклянные шарики диаметром 0,1 мм, а у Cotaphote Div., Ferro Corp., Jackson, Miss., — диаметром 0,074—0,110 мм, класс IV, № 1420, тип C). Дополнительная информация по этому вопросу содержится в разд. 5.1.3.

22.1.2. Грамположительные бактерии

Обычно для того, чтобы сделать грамположительные бактерии чувствительными к лизису под действием ДСН, клеточные стенки расщепляют лизоцимом, который добавляют к суспензии клеток в разведенном солевом буфере (1:5), как описано выше. Инкубационный период может составлять от нескольких минут до нескольких часов. Периодически отбирают пробы и проверяют клетки на лизис под действием ДСН. Перед добавлением ДСН к основной суспензии ионную силу буфера вновь увеличивают до исходного значения. Так же как в случае с грамотрицательными бактериями, лучше брать клетки в экспоненциальной фазе роста. Другие пути повышения способности грамположительных бактерий лизироваться под действием ДСН заключаются в добавлении пенициллина к активно растущим культурам или в выращивании культуры при высоких концентрациях глицина [60].

Если размер фрагментов ДНК не имеет значения, то физическое разрушение клеток — процедура легкая и

простая. Вообще, с помощью пресса Френча грамотрицательные бактерии разрушаются легче, чем грамположительные. Наш опыт показывает, что встряхивание со стеклянными шариками (т. е. с помощью гомогенизатора фирмы Бронвилл, как было описано выше) эффективно и для тех и для других бактерий. Во всех описанных ниже методиках можно использовать фрагментированную ДНК, однако для иммобилизации на нитроцеллюлозных фильтрах (разд. 22.6.5) и для введения метки *in vitro* (разд. 22.6.3) предпочтительна ДНК с большой молекулярной массой.

При определении температуры тепловой денатурации, или температуры плавления (T_m ; разд. 22.5.1), все препараты ДНК, включая ДНК-стандарт, должны обрабатываться одинаково.

22.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Выделение ДНК для изучения гомологии занимает больше всего времени и вызывает наибольшие технические трудности. Ниже описаны два метода выделения ДНК из 0,5—1,0 л культуры (если культура не доросла до достаточно высокой плотности, может потребоваться больший объем).

22.2.1. Метод Мармура [44]

По методу Мармура, который, вероятно, является наиболее распространенным, белок из лизата удаляют хлороформом. Ниже дано краткое описание этого метода.

Реактивы

Солевой буфер с ЭДТА: 0,15 М NaCl; 0,01 М ЭДТА, рН 8,0.

ДСН: 20%-ный (вес/объем) раствор.

Перхлорат натрия: 5 М раствор.

Буфер SSC: 0,15 М NaCl, 0,015 М тринатрийцитрат, рН 7,0. *Примечание.* Иные концентрации буфера SSC обозначены в тексте следующим образом: $20\times$ (20-кратная концентрация) или $0,1\times$ (1/10 исходной концентрации).

Рибонуклеаза (РНКаза): бычья панкреатическая РНКаза (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 1 мг/мл в 0,15 М NaCl, pH 5,0. Раствор нагревают при 80 °C в течение 10 мин для инактивации следов ДНКаза и хранят в холодильнике.

Методика

1. Отцентрифугированные клетки суспендируют в 50—100 мл солевого буфера с ЭДТА и разрушают одним из ранее описанных методов (разд. 22.1).

2. Добавляют перхлорат натрия до конечной концентрации 1 М.

3. Добавляют 0,5 объема смеси хлороформ — изопентанол и встряхивают 30 мин на качалке в колбе с притертой стеклянной пробкой. Скорость встряхивания должна быть достаточной для получения эмульсии, в то время как очень сильное встряхивание нежелательно.

4. Эмульсию центрифугируют при 17 000 g в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением при температуре от 0 до 4 °C.

5. Осторожно сливают или удаляют пипеткой верхний водный слой из каждой пробирки, стараясь не затронуть белый осадок (белок) на границе раздела фаз. Для этого 10-мл серологическую пипетку вставляют кончиком вверх в пипетку типа Propipette (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, Pa.). Водный слой содержит ДНК и поэтому отличается высокой вязкостью. Рекомендуется, отбирая жидкость, постоянно передвигать пипетку в пробирке из стороны в сторону во избежание захвата белка с поверхности.

6. Повторно экстрагируют лизат, выполняя операции 3—5.

7. Водную фазу помещают в химический стакан и медленно вливают туда холодный 95%-ный этанол (добавляют около двух объемов водной фазы). Осажденную ДНК собирают стеклянной палочкой, осторожно размешивая обе фазы круговыми движениями. ДНК прилипает к палочке или наматывается на нее (рис. 22.1). Избыток этанола удаляют, прижимая палочку с ДНК к стенке стакана; затем для удаления остатков этанола палочку на несколько минут устанавливают вертикаль-



Рис. 22.1. Наматывание ДНК на стеклянную палочку во время осаждения ее этанолом
Фото Д. Арбора

←

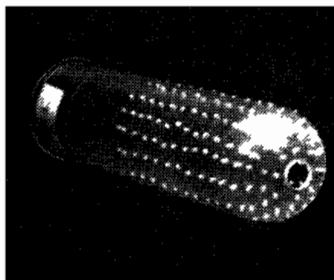


Рис. 22.2. Перфорированная полипропиленовая центрифужная пробирка объемом 50 мл для сбора осажденной ДНК. Мелкие отверстия делают электродрелью и обычными тонкими сверлами (размер не имеет значения). Диаметр большого отверстия 6 мм. Перед внесением ДНК его закрывают пробкой от пенициллинового флакона Фото Н. Крига.

но, так чтобы ее конец, на котором намотана ДНК, был обращен вверх. Другим способом после добавления холодного этанола колбу встряхивают круговыми движениями. При этом образуется сгусток ДНК, который отделяют, сливая содержимое колбы в 50-мл полипропиленовую центрифужную пробирку, имеющую несколько отверстий на стенках (по всей окружности) и большое отверстие на дне (рис. 22.2). Перед вливанием содержимого колбы в пробирку необходимо убедиться в том, что большое отверстие закрыто пробкой. Затем осажденную ДНК промывают 1—2 раза буферно-эта-

нольной смесью (1 : 2) и оставляют пробирку до полного стекания этанола.

8. Стекланную палочку с налипшей ДНК помещают в 10—20 мл буфера $0,1 \times \text{SSC}$ и держат там до размягчения ДНК и удаления ее с палочки. Если пользуются вторым способом, из отверстия на дне перфорированной пробирки вынимают пробку, ставят пробирку в небольшой химический стакан (или в другую пробирку с объемом, слегка превышающим объем полипропиленовой пробирки) и добавляют 10 мл буфера $0,1 \times \text{SSC}$. Сгусток ДНК начинает растворяться и при извлечении полипропиленовой пробирки проходит через ее нижнее отверстие. Перфорированную пробирку промывают второй порцией буфера (10 мл), которую объединяют с первой. Сгусток ДНК растворяется быстрее, чем ДНК, намотанная на палочку. После полного растворения ДНК концентрацию буфера SSC доводят до $1 \times$, добавляя необходимое количество буфера $20 \times \text{SSC}$.

9. К препаратам ДНК добавляют РНКазу (50 мкг/мл) и инкубируют 30 мин при 37°C .

10. В раствор ДНК добавляют 5—10 мл смеси хлороформ — изопентанол и встряхивают 15 мин на качалке, как описано в п. 3. Эмульсию центрифугируют (см. п. 4) и надосадочную жидкость сливают (см. п. 5). Экстракцию смесью хлороформа и изопентанола повторяют до тех пор, пока после центрифугирования на поверхности раздела фаз почти не останется белка.

11. ДНК осаждают этанолом, наматывая на палочку, и растворяют в буфере $0,1 \times \text{SSC}$. Процедуру повторяют 2—3 раза для удаления рибонуклеотидов. Каждый раз перед осаждением этанолом концентрацию буфера SSC доводят до $1 \times$.

12. Наконец, растворяют ДНК в буфере $0,1 \times \text{SSC}$ и хранят в морозильнике при -20°C или, добавив в пробирку 2—3 капли хлороформа, в холодильнике.

22.2.2. Метод адсорбции ДНК на гидроксилapatите

Первыми выделили ДНК методом адсорбции на гидроксилapatите Бриттен и др. [13]. С тех пор появились описания нескольких модификаций этого метода [32, 35, 43, 47]. Ниже приводится один из наиболее удачных вариантов.

Реактивы

Солевой буфер с ЭДТА (разд. 22.2.1); 20%-ный (вес/объем) раствор ДСН (разд. 22.2.1); РНКазы (разд. 22.2.1); жидкий фенол, хроматографически чистый, насыщенный водой; гидроксилапатит; предназначенный для фракционирования ДНК биогель НТР (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.); 1,0 М фосфатный буфер, pH 6,8 (готовят, смешивая равные объемы 1 М Na_2HPO_4 и 1 М NaH_2PO_4); этот основной раствор используют для приготовления разбавленных растворов, как указано в тексте.

Методика

1. Отцентрифугированные клетки суспендируют в 25 мл физиологического раствора + ЭДТА и добавляют 0,5 мл раствора РНКазы.

2. Добавляют 1,2 мл раствора ДСН. Колбу вращают, нагревая в водяной бане при 50—60°C до завершения лизиса клеток. Методика для бактерий, не разрушающихся под действием только одного детергента, описана в разд. 22.1.

3. Вязкость лизата снижают короткой обработкой ультразвуком. При этом можно добавлять проназу *b* или протеиназу *K* (50 мкг/мл). Для одних микроорганизмов расщепления протеиназой не требуется, а для других оно необходимо. При добавлении протеиназы ее инкубируют с лизатом при 50°C в течение 1 ч.

4. Добавляют 7 мл жидкого водонасыщенного фенола, встряхивают, сначала держа колбу в руке, чтобы две фазы хорошо перемешались, а затем 20 мин на качалке.

5. Центрифугируют при 17 000 g в полипропиленовой центрифужной пробирке в охлаждаемой центрифуге при 0—4°C. Осторожно сливают верхний (водный) слой (разд. 22.2.1, п. 5) и вновь наливают его в колбу.

6. Повторяют пп. 4 и 5.

7. Добавляют 2,0 мл 1,0 М фосфатного буфера. Затем добавляют 2 г (удобно пользоваться чайной ложкой с измеренным объемом) сухого гидроксилапатита. Хорошо суспендируют и осторожно встряхивают на качалке вращающего или возвратно-поступательного дей-

ствия в течение 1 ч с такой скоростью, чтобы гидроксил-апатит не оседал.

8. Суспензию переносят в 50-мл полипропиленовую центрифужную пробирку и центрифугируют 2—3 мин при 5000 g при комнатной температуре. Слой надоса-дочной жидкости (лизат) выливают в колбу (его можно использовать для повторной адсорбции ДНК), а осаж-денный гидроксилapatит (на котором теперь адсорбиро-вана ДНК) используют в п. 9.

9. К осажденному гидроксилapatиту добавляют 8 мл 0,1 М фосфатного буфера. Гидроксилapatит суспенди-руют с помощью встряхивателя Vortex. Сразу же вли-вают еще 24 мл фосфатного буфера (это удобно делать с помощью автоматической пипетки). Фосфатный буфер следует вливать под давлением так, чтобы гидроксил-apatит равномерно размешивался для максимального разбавления нуклеотидов и фенола. Выжидают 1—2 мин, пока гидроксилapatит осядет, и центрифугируют 2—3 мин при 5000 g. Надосадоочную жидкость отбрасы-вают.

10. Процедуру, описанную в п. 9, повторяют 6—7 раз до тех пор, пока оптическая плотность надосадоочной жидкости при 270 нм (максимум поглощения фенола) не станет менее 0,05.

11. Для десорбции ДНК гидроксилapatит суспенди-руют в 5,0 мл 0,5 М фосфатного буфера. Центрифуги-руют, как раньше, но на этот раз надосадоочную жид-кость, содержащую ДНК, не выбрасывают.

12. Если бóльшая часть ДНК не была удалена из лизата во время процедуры, описанной в п. 8, то после этапа 11 гидроксилapatит промывают один раз дистил-лированной водой и затем добавляют его в лизат для второго цикла адсорбции. ДНК, полученную после вто-рого цикла адсорбции, добавляют в первую порцию выделенной ДНК.

13. Препарат ДНК фильтруют через фильтр из стек-ловолокна (Reeve Angel Inc., Clifton, N. J., диаметр 2,4 см, тип 934АН) с держателем по типу шприца (Gelman Instrument Co., Ann Arbor, Mich.) для удале-ния остатков частиц гидроксилapatита.

14. Препарат ДНК анализируют против буферного рас-твора 0,02 М NaCl + 10^{-3} М N-2-гидроксиэтилпипера-

зиннатриевая соль N'-2-этансульфоновой кислоты (HEPES), pH 7,0. Нарезают отрезки диализной трубки (Fisher Scientific Co., Pittsburgh) по 13—15 см и вымывают из нее УФ-поглощающие вещества. Для этого трубку в течение нескольких минут кипятят в 2—5%-ном растворе карбоната натрия, тщательно промывая ее водопроводной, а затем дистиллированной водой. Трубки можно хранить в холодильнике в течение 2—3 дней в дистиллированной воде. При более длительном хранении целлюлолитические организмы могут гидролизовать их. Конец трубки завязывают узлом, наливают в образовавшийся мешок раствор ДНК и завязывают узлом второй конец или перевязывают его бечевкой. К бечевке прикрепляют ярлык. Диализуют против 400—500 объемов буфера около 3 ч, меняют буфер и затем продолжают диализ в течение ночи. Препараты ДНК хранят в морозильнике или, добавив в них несколько капель хлороформа, в холодильнике.

Замечания

Если лизат расщепляют проназой или протеиназой K, обычно достаточно одной экстракции фенолом.

Важной чертой описанной выше методики является то, что в ходе операций молекулы РНК всех видов деградируют до такой степени, что не конкурируют с ДНК за адсорбционные центры на гидроксилapatите. Для некоторых микроорганизмов, помимо панкреатической РНКазы, может потребоваться РНКаза T1. На этапе 1 добавляют 50—100 ед. Sankyo РНКазы T1 (Calbiochem-Behring, La Jolla, Calif.). Для ряда микроорганизмов на этапе 1 РНКаза может ингибироваться. Чтобы устранить ингибирование, лизат диализуют в течение нескольких часов против физиологического раствора + ЭДТА.

Помимо РНК, основной примесью в препаратах ДНК являются полисахариды. Многие полисахариды не адсорбируются на гидроксилapatите и поэтому легко отделяются от ДНК при добавлении к ее раствору этого сорбента. Однако некоторые полисахариды связываются с гидроксилapatитом и снижают адсорбцию ДНК.

Для успешного осуществления описанного выше метода иногда требуется более разбавленная клеточная

суспензия. Очевидно, разбавление влияет на завершенность лизиса и (или) деградацию РНК. Увеличивают объемы в 4—5 раз и повторяют описанные выше этапы до стадии адсорбции на гидроксилапатите. Добавив гидроксилапатит к части лизата, суспензию гидроксилапатита вливают в 60-мл фильтр из огнеупорного стекла. После того как гидроксилапатит частично осядет, через фильтр пропускают весь лизат. Затем гидроксилапатит переносят в центрифужную пробирку и завершают процедуру, как описано выше.

Разработано много дополнительных модификаций методов выделения ДНК; некоторые из них даны в работе [30].

22.3. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК

Большая часть нуклеиновых кислот в бактериальной клетке представлена РНК (в основном рРНК и в меньшей степени тРНК и мРНК); поэтому выделить РНК в больших количествах довольно просто. Основная проблема заключается в получении препаратов РНК, не содержащих РНКазу. Этот фермент довольно широко распространен и, кроме того, весьма устойчив к нагреванию. Со стеклянной посуды РНКазу лучше всего удаляется прокаливанием в муфельной печи или печи для стерилизации сухим жаром. Водные буферы и растворы обрабатывают вначале автоклавированием, а затем добавлением 0,2%-ного диэтилпирокарбоната [22].

Методы выделения РНК подробно описаны Кирби [38]. Ниже приводится один из наиболее удачных вариантов метода выделения бактериальной РНК, достаточно хорошо очищенной от ДНК.

Реактивы

Нафталин-1,5-дисульфонат натрия, 10%-ный раствор (вес/объем).

Смесь фенол — крезол: 550 мл жидкого фенола, 70 мл м-крезола и 0,5 г 8-гидроксихинолина.

Диэтилпирокарбонат (добавляют непосредственно перед лизированием клеток из-за его слабой устойчивости в воде).

Буфер SSC (разд. 22.2.1). Готовят также буфер SSC, содержащий 1%-ный ДСН.

ДСН, 20%-ный раствор (разд. 22.2.1).

Методика

1. Клетки собирают центрифугированием и промывают один раз дистиллированной водой. Суспендируют их приблизительно в 20 мл холодной дистиллированной воды и измеряют объем суспензии с помощью мерного цилиндра.

2. На каждый 1,0 мл суспензии добавляют по 0,05 мл 10%-ного нафталиндисульфоната, а также диэтилпиروкарбонат до конечной концентрации 0,2%. После этого клетки немедленно разрушают, пропуская через пресс Френча при давлении от $7 \cdot 10^7$ до $8,4 \cdot 10^7$ Па (700—840 кг/см²) в сосуд, содержащий 15 мл смеси фенол — крезол, 10 мл 0,5%-ного нафталиндисульфоната и 0,02 мл диэтилпиروкарбоната.

3. Колбу встряхивают 20 мин на качалке. Смесь помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку и центрифугируют 10 мин при 17 000 g в охлаждаемой центрифуге при 0—4°C. Осторожно сливают верхний (водный) слой и сохраняют его.

4. Добавляют буфер 20 × SSC (1 часть на 20 частей воды) и ДСН до конечной концентрации 1%.

5. Добавляют 15 мл смеси фенол — крезол, встряхивают и центрифугируют при 17 000 g в охлаждаемой центрифуге. Водный слой сохраняют.

6. Добавляют 2 объема ледяного 95%-ного этанола, смешивают и оставляют в морозильнике на 30—60 мин. Центрифугируют 10 мин при 4 000 g в охлаждаемой центрифуге. Сливают надосадочную жидкость, дожидаясь полного стекания жидкости со стенок центрифужной пробирки.

7. Осадок (РНК) растворяют в 30 мл буфера SSC. Осаждение этанолом, центрифугирование и растворение повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не перестанет поглощать при 270 нм. РНК хранят в буфере SSC, содержащем 1% ДСН, при температуре —20°C или ниже.

Суммарная РНК, выделенная по описанной выше методике, обычно используется в качестве конкурента

в экспериментах по конкуренции (разд. 22.7.3); при желании ее можно расфракционировать на компоненты. Препараты радиоактивной РНК обычно фракционируют (разд. 22.7.1) и компоненты используют в опытах по гибридизации.

22.4. КОНЦЕНТРАЦИЯ И СТЕПЕНЬ ЧИСТОТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

22.4.1. УФ-спектрофотометрия

Наиболее распространенный метод определения концентрации нуклеиновых кислот в растворах при комнатной температуре состоит в измерении оптической плотности (поглощения) при 260 нм. При использовании кювет толщиной 1 см величину оптической плотности определяют по следующим формулам [5, 59].

Для нативной (двухцепочечной) ДНК:

$$\text{мг/мл} = \frac{\text{Оптическая плотность при 260 нм}}{20}.$$

Для РНК или денатурированной (одноцепочечной) ДНК:

$$\text{мг/мл} = \frac{\text{Оптическая плотность при 260 нм}}{23}.$$

На практике концентрация ДНК в большинстве исходных препаратов варьирует от 0,5 до 2 мг/мл. Удобнее всего делать разведение 1 : 20 (0,1 мл раствора ДНК добавляют к 1,9 мл буфера). При этом величина поглощения не превышает пределов измерения большинства спектрофотометров и ее определяют прямо в миллиграммах ДНК на 1 мл исходного препарата.

Метод УФ-спектрофотометрии используют также для обнаружения примесей. 1) Белки сильно поглощают свет при 280 нм. Показателем загрязнения исследуемого раствора белком служит отношение величины оптической плотности раствора нуклеиновой кислоты при 260 нм к ее величине при 280 нм (A_{260}/A_{280}). Однако коэффициент экстинкции белка очень низок по сравнению с коэффициентом экстинкции нуклеиновых кислот, и, следовательно, отношение A_{260}/A_{280} нельзя считать

очень чувствительным показателем присутствия примесей. 2) Спектр поглощения нуклеиновых кислот имеет максимумы приблизительно при 208 и 260 нм, а минимум — при 234 нм. Пик при 208 нм не специфичен для нуклеиновых кислот, так как при этой длине волны поглощают свет многие соединения. Если в препарате нуклеиновой кислоты содержится примесь, поглощающая при 208 нм, то оптическая плотность в минимуме спектра нуклеиновой кислоты будет завышена. Таким образом, отношение A_{234}/A_{260} — довольно чувствительный показатель присутствия примеси в препарате ДНК. 3) Максимум поглощения фенола расположен при 270 нм. Отсюда следует, что отношение A_{270}/A_{260} — достаточно чувствительный показатель загрязнения препарата нуклеиновой кислоты фенолом.

22.4.2. Гиперхромизм

Основной примесью в препаратах ДНК обычно является РНК. Эти две нуклеиновые кислоты невозможно дифференцировать непосредственно по их поглощению в УФ-области. Определение фракции препарата, соответствующей ДНК, можно провести с помощью измерения гиперхромизма, наблюдаемого при тепловой денатурации ДНК (разд. 22.5). При этом поглощение препарата чистой нативной ДНК при 260 нм возрастает приблизительно на 40%. Если вторичная структура примесной РНК разрушается РНКазой, то для РНК гиперхромизма не наблюдается, но если вторичная структура РНК не нарушается, то величина гиперхромизма для нее составляет приблизительно 30%. Плавление РНК происходит при более низкой температуре и в более широком температурном интервале, чем в случае ДНК, поэтому кривые плавления для РНК и ДНК легко различаются. Для определения процентного содержания ДНК в препарате необходимо разделить величину гиперхромизма, связанного с ДНК, на 0,4 и умножить на 100.

22.4.3. Определение концентрации ДНК в реакции с дифениламином

Реакция с дифениламином специфична для дезоксирибозы в ДНК. Хотя наиболее распространенной явля-

ется методика Бертон (разд. 17.5.1), ниже мы приводим методику в модификации Жилия и Мейерса [27], для которой характерна высокая чувствительность.

1. 1 мл раствора ДНК помещают в пробирку (16×125 мм) с завинчивающейся крышкой и добавляют к нему 1,0 мл 20%-ной (вес/объем) хлорной кислоты.

2. Добавляют 2,0 мл ледяной уксусной кислоты, содержащей 4% (вес/объем) дифениламина.

3. Добавляют 0,2 мл 0,16%-ного (вес/объем) раствора ацетальдегида.

4. Пробу перемешивают и инкубируют в течение ночи при 30°C.

5. Определяют оптическую плотность при 595 и 700 нм и вычисляют разницу. Сравнивают ее с величинами, полученными для стандартов, содержащих известные количества чистой стандартной ДНК (ДНК тимуса теленка или спермы лосося; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), и определяют концентрацию ДНК в пробе. Эта методика хороша для растворов очищенной ДНК с концентрацией от 5 до 50 мкг/мл.

Ее можно применять в ходе изучения гомологии ДНК при количественных определениях ДНК, связанной с нитроцеллюлозными мембранами. Она особенно полезна в экспериментах по гомологии рРНК, когда необходимо узнать количество ДНК, присутствующей на мембране в конце гибридизации. После измерения радиоактивности мембраны удаляют из сцинтилляционной жидкости (используют смесь на основе толуола для того, чтобы мембраны не растворялись и радиоактивность не вымывалась) и сушат на воздухе. Затем мембраны помещают в 10%-ную хлорную кислоту (2 мл) и нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения проб до комнатной температуры осуществляют описанный выше этап 2.

22.4.4. Определение РНК в реакции с орцином

Орцин применяется для определения концентраций РНК, хотя в ограниченной степени он реагирует и с ДНК. Подробно эта методика описана в разд. 17.5.2.

22.5. СОСТАВ ОСНОВАНИЙ ДНК

Существует несколько методов определения молярных процентов гуанина и цитозина (мол. % G+C) в ДНК, которые мы перечислим ниже: 1) гидролиз и последующее разделение нуклеотидов или пуриновых или пиримидиновых оснований; 2) определение плавучей плотности; 3) определение температуры плавления (денатурации); 4) бромирование [58]; 5) апуринизация [37]; 6) определение отношения A_{260}/A_{280} в буфере с низкой ионной силой при pH 3 [25]; 7) жидкостная хроматография под высоким давлением нуклеотидов или свободных оснований [14, 39]. Примесь РНК мешает определению всеми этими методами, за исключением методов, основанных на измерении плавучей плотности и температуры плавления (T_m), поэтому последние стали наиболее популярными.

22.5.1. Метод, основанный на измерении плавучей плотности

Этот метод включает аналитическое ультрацентрифугирование, описание которого выходит за рамки данной главы. Он описан Манделем и сотр. [42].

22.5.2. Метод, основанный на анализе кривых плавления

Впервые корреляция между температурой плавления (T_m) и составом оснований ДНК была описана Мармуром и Доти [45]. Мандель и др. [41] и ДеЛей [18] повторно исследовали эту корреляцию и также пришли к выводу о наличии связи между значениями T_m и плавучей плотности. Феррагут и Леклерк [23] сравнили методы определения T_m по кривым плавления. На значение T_m сильно влияет ионная сила используемого буфера, причем это характерно для всех препаратов ДНК. Следовательно, необходимо либо знать ионную силу применяемого буфера, либо использовать стандартный препарат ДНК, имеющий ту же ионную силу, что и неизвестные образцы. Последнее легко сделать: следует просто диализовать все препараты ДНК (включая стандартную ДНК) в одной и той же партии буфера.

Методика

Эта методика достаточно надежна, ее можно использовать не только с приведенными ниже, но и с другими буферами.

1. Готовят 2—4 л буфера $0,5 \times \text{SSC}$ (разд. 22.2.1), рН 7,0. Часть буфера оставляют для разбавления препаратов ДНК и для промывания кювет непосредственно перед тем, как вносят в них образцы ДНК. Оставшееся количество делят на 2 равные части так, чтобы во время диализа можно было один раз сменить буфер (см. этап 3).

2. Готовят пробы ДНК по 2—5 мл (в зависимости от размера используемых кювет) с концентрацией 50 мкг/мл, применяя для разбавления исходных препаратов ДНК буфер $0,5 \times \text{SSC}$. Готовят 10—20 мл раствора ДНК-стандарта (например, известно, что содержание G+C в ДНК *E. coli* равно 51 мол.%, а температура плавления T_m в буфере SSC $90,5^\circ\text{C}$), поскольку ее необходимо провести через все стадии анализа.

3. Диализуют одновременно все препараты в течение

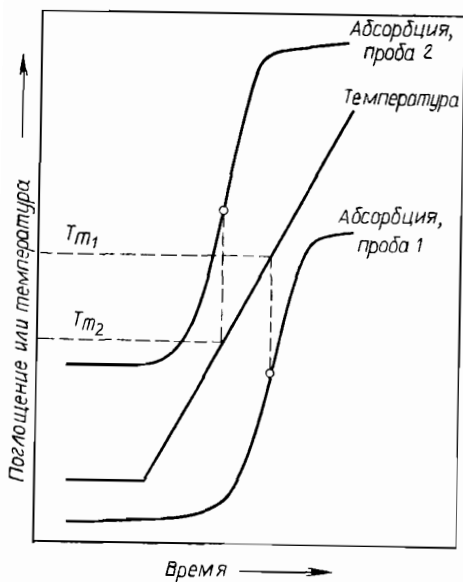


Рис. 22.3. Кривые плавления для двух образцов ДНК, полученные с помощью регистрирующего спектрофотометра. Точки пересечения любой вертикальной линии с кривыми поглощения и температуры представляют собой значения этих параметров в данное время. Точки перегиба на кривых плавления соответствуют температурам плавления (T_m).

ночи в буфере $0,5\times\text{SSC}$. После первых нескольких часов диализа буфер заменяют. По окончании диализа препараты ДНК снова переносят в пробирки с завинчивающимися крышками.

4. Определяют кривую плавления с помощью регистрирующего спектрофотометра с термостатируемой ячейкой для кювет, в которую вмонтирована термopapa.

5. Определяют значения T_m , как показано на рис. 22.3.

6. Вычисляют молярные проценты $G+C$ в образце ДНК с помощью уравнения [26]:

$$\begin{aligned} \text{мол. \% } (G+C)_x &= \\ &= \text{мол. \% } (G+C)_{\text{ст}} + 1,99(T_{m(x)} - T_{m(\text{ст})}), \end{aligned}$$

где мол. % $(G+C)_{\text{ст}}$ — известные мол. % $(G+C)$ стандартной ДНК, а $T_{m(x)}$ и $T_{m(\text{ст})}$ — значения T_m для изучаемого образца ДНК и стандартной ДНК соответственно.

22.6. ГОМОЛОГИЯ ДНК

Для определения сходства последовательностей нуклеотидов в цепях ДНК (или РНК) у различных организмов изучают гомологию и термостабильность ДНК (РНК). При изучении гомологии можно измерить долю геномов (или долю специфических генов, таких, как гены рРНК), которые при определенной ионной силе и температуре способны образовывать двухцепочечные комплексы. Изучение термостабильности позволяет определить степень ошибочного образования пар оснований в гетеродуплексах (гибридах).

Существует два общих метода изучения гомологии. Первый из них, который часто называют мембранным методом, заключается в следующем. Сначала иммобилизуют денатурированную (одноцепочечную) немеченую ДНК на нитроцеллюлозном фильтре, на котором добавляемая двухцепочечная ДНК не адсорбируется. Затем этот фильтр инкубируют в присутствии фрагментов радиоактивной денатурированной ДНК (или РНК, если изучается гомология РНК). Двухцепочечные комплексы цепей ДНК с радиоактивными цепями ДНК (или цепя-

ми РНК в случае изучения гомологии РНК), образующиеся в результате специфического взаимодействия, при последующем промывании фильтра не разрушаются, и их количество можно определить, измерив радиоактивность фильтра.

Другой метод изучения гомологии, который можно назвать методом реассоциации в растворе, основан на связывании одноцепочечных нуклеиновых кислот в растворе, т. е. в данном случае, в отличие от мембранного метода, когда один из компонентов связан, оба компонента находятся в растворе. За реассоциацией цепей ДНК можно следить с помощью ультрафиолетовой спектрофотометрии или, в случае инкубации небольшого количества денатурированной ДНК с высокой удельной радиоактивностью в присутствии большого избытка немеченой денатурированной ДНК, с помощью измерения радиоактивности. В последнем случае способность меченых фрагментов образовывать двухцепочечные комплексы с немеченой ДНК количественно определяют по адсорбции на гидроксилapatите или по устойчивости к гидролизу нуклеазой S1.

Оптические методы определения реакций в растворе в данной главе не рассматриваются. Они описаны в работах [1, 6, 12, 19, 51 и 59].

22.6.1. Специальное оборудование для изучения гомологии ДНК

На рис. 22.4—22.7 изображены некоторые специально сконструированные устройства для изучения гомологии ДНК. Реакционные сосуды (рис. 22.5) представляют собой пирексовые трубки с внешним диаметром 6 мм, нарезанные на отрезки длиной 2,2 см и запаянные на одном конце. Трубки закрывают пенициллиновыми пробками с обрезанными краями. Растворы наливают в реакционные сосуды с помощью автоматических микропипеток со сменными наконечниками (рис. 22.4, Д). Общий объем жидкости в каждом сосуде 110 мкл. Такого количества как раз достаточно для покрытия мембран, помещаемых в сосуды при изучении гомологии ДНК мембранным методом (рис. 22.5); в случае применения метода реассоциации в растворе такой объем

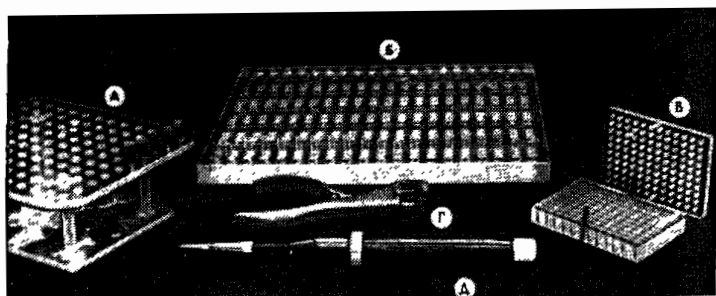


Рис. 22.4. Приспособления, используемые для изучения гомологии мембранными методами. А. Плексигласовый штатив для пробирок, которые инкубируют в водяной бане. На фотографии видны 5 пробирок, установленных в штативе (см. также рис. 22.5). Б. Плексигласовый штатив, в который устанавливают пробирки во время их заполнения. В. Плексигласовая камера для мембранных фильтров. Видны верхняя и нижняя панели. В правой части нижней панели установлены 5 фильтров (см. также рис. 22.5). Г. Пробойник для вырезания продолговатых мембранных фильтров. Д. Автоматическая микропипетка с заменяемым кончиком, используемая для добавления компонентов в реакционные смеси. Фото Н. Крига.

позволяет отобрать 100 мкл пробы для нанесения на гидроксилapatит или для реакции с нуклеазой S1. Компоненты вносят в реакционные сосуды, установленные в плексигласовый штатив (рис. 22.4, А) с двойным рядом отверстий, позволяющий наблюдать за их внесением. После заполнения сосуда закрывают пробками и устанавливают в плексигласовом штативе (рис. 22.5) в водяную баню для инкубации. Размер бани должен быть достаточным для того, чтобы штатив был полностью погружен в воду, а колебания температуры не должны превышать $\pm 0,1^\circ\text{C}$. При неполном погружении штатива возникает опасность испарения и скопления капель чистой воды на стенках сосудов и крышках, что сильно влияет на ионную силу и концентрацию нуклеиновой кислоты. При применении мембранного метода пользуются продолговатыми мембранными фильтрами (3 $\times$ 9 мм), которые вырезают из больших фильтров (диаметром до 15 см) с помощью пробойника (рис. 22.4, Г; номер по каталогу 5302, McBee Systems,

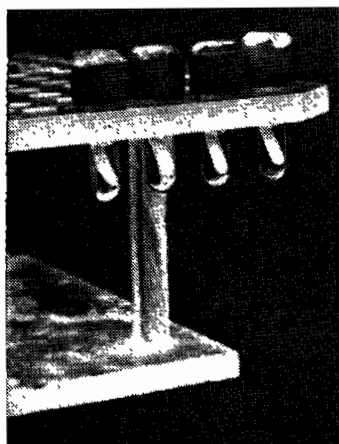


Рис. 22.5. Крупный план фрагмента фотографии штатива для реакционных пробирок, изображенного на рис. 22.4. Видны мембранные фильтры, погруженные в реакционную смесь в пробирках. Пробирки плотно закрыты пробками от пенициллиновых флаконов с обрезанными выступами. Фото Н. Крига.

←

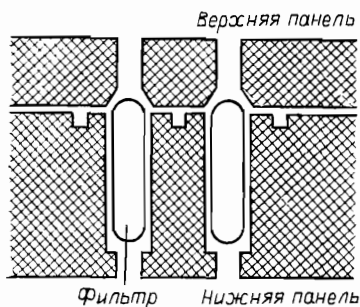


Рис. 22.6. Поперечный срез плексигласовой камеры для отмывки мембранных фильтров.

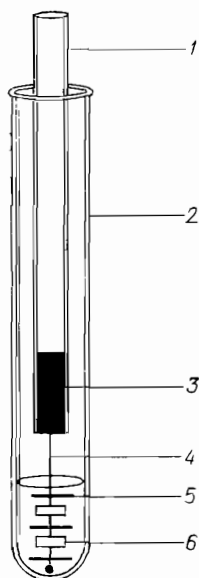


Рис. 22.7. Схематическое изображение устройства для определения термостабильности гибридных двухцепочечных комплексов. Отрезок стеклянной трубки диаметром 7 мм (1) закрыт резиновой пробкой (3), вырезанной из большой резиновой пробки с помощью специального сверла. Мембранные фильтры (5) и тефлоновые прокладки (6) насажены на булавку (4) ближе к ее головке. Острие булавки вставлено в резиновую пробку. Трубка с булавкой находится в стеклянной пробирке (2) размером 13×10 мм, содержащей 1,2 мл буфера 0,5×SSC. Пробирку помещают в нагретую водяную баню.

Roanoke VA 23224). Форма фильтров может быть и иной, но продолговатый фильтр удобен тем, что он располагается в сосуде под углом (рис. 22.5). Такая форма обеспечивает максимальный контакт фильтра с раствором и высокое значение отношения поверхности к объему, а также облегчает его внесение в сосуд и извлечение. Мембранные фильтры отмывают от непрореагировавших радиоактивных фрагментов в плексигласовой камере с 120 ячейками (рис. 22.4, В и 22.6). Камера состоит из верхней и нижней панелей; мембранные фильтры помещают в нижней панели, после чего привинчивают к ней болтиками верхнюю панель. В собранном виде камера достаточно компактна, она помещается в 400-мл химический сосуд.

Фильтровальные устройства, используемые для приготовления ДНК-мембран (мембран, к которым присоединена денатурированная ДНК), имеют встроенные фильтры из пористого полиэтилена. Основанием устройства служит невысокий цилиндр из плексигласа с таким же внешним диаметром, как у мембраны.

Пористый полиэтилен доверху заполняет внутреннюю часть цилиндра. От основания цилиндра отходит выходная трубка с зажимом для регулирования скорости потока. Верхняя часть прибора состоит из плексигласового цилиндра с неопреновой прокладкой (толщиной 3 мм), приклеенной к его нижнему краю. Верхнюю часть помещают на мембрану и закрепляют пружиной. Все приспособления из плексигласа можно изготовить в механической мастерской.

Термостабильность связанных с мембраной двухцепочечных комплексов можно определить с помощью устройства, изображенного на рис. 22.7.

22.6.2. Получение меченой ДНК: метод *in vivo*

Для опытов по изучению гомологии можно вводить метку в ДНК *in vivo* или *in vitro*.

Введение метки в ДНК *in vivo* зависит от среды, необходимой для выращивания микроорганизмов, а также от включаемых ими предшественников нуклеиновой кислоты. Среди ^3H - или ^{14}C -предшественников нуклеиновых кислот чаще других используют аденин, тимидин и де-

зоксиаденозин. Их включение обычно не подавляется дрожжевым экстрактом до концентрации его в среде 0,1 %. В некоторых случаях дрожжевой экстракт используют для подавления биосинтеза предшественников, что позволяет осуществлять их непосредственное включение в ДНК. Пригодность того или иного меченого предшественника можно легко определить, поместив его в пробирку со средой, инокулированной испытуемым организмом. После того как культура вырастет, с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика измеряют радиоактивность культуры, а также надосадочной жидкости после удаления клеток центрифугированием. Снижение числа импульсов в надосадочной жидкости по сравнению с культурой свидетельствует о включении метки. Включение $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ или $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ наиболее эффективно проходит в среде без пептона, содержащей не более $1,5 \cdot 10^{-4}$ М фосфата. Если для роста культуры требуются пептоны и в особенности дрожжевой экстракт, фосфат можно удалить осаждением его в виде бариевой, кальциевой или магниевой солей.

Методика

Ниже приводится методика, описанная Хайесом и Гросом [31].

1. 100 г дегидратированного питательного бульона (Difco) и 50 г казаминовых кислот (Difco) растворяют в 900 мл воды.

2. Добавляют 50 мл 1 М ацетата бария. (При использовании других пептонов или дрожжевого экстракта необходимо путем титрования определить точное количество ацетата бария.) Осадок удаляют фильтрованием.

3. К фильтрату добавляют 5 мл 1 М сульфата натрия, оставляют на 15 мин и снова фильтруют. Проверяют наличие остаточного бария с помощью родизоновой кислоты (осадок красного цвета, выпадающий в результате образования бариевой соли родизоновой кислоты, можно наблюдать при концентрациях, в 10 раз меньших, чем при осаждении в виде BaSO_4).

4. Доводят объем до 1 л и используют в виде концентрата (10×) для приготовления меченой среды.

5. Выделяют ДНК из меченых клеток по методу, описанному в разд. 22.2, и растворяют ее в буфере $0,1 \times \text{SSC}$. В опытах по определению гомологии мембранным методом (разд. 22.6.5) используют ДНК в концентрации от 50 до 100 мкг/мл (удельная активность должна составлять не менее 10^3 имп/мин·мкг). Если применяют метод с использованием гидроксилапатита или нуклеазы S1, то ДНК с удельной радиоактивностью $0,5 \cdot 10^5$ — $2,5 \times 10^5$ имп/(мин·мкг) берут в концентрации не более 5 мкг/мл. При низкой концентрации ДНК добавляют около 30 мкг на 1 мл препарата фрагментированной ДНК из спермы лосося во избежание адсорбции меченой ДНК на стекле. Препарат ДНК дважды пропускают через пресс Френча под давлением $11,2 \cdot 10^7$ Па.

22.6.3. Получение меченой ДНК: метод *in vitro*

ДНК можно иодировать ^{125}I , получая активность более 10^7 имп/мин·мкг. Мы не рассматриваем здесь процедуру иодирования, подробное описание ее дано в работах [16, 49, 52, 56].

Другим способом введения метки в ДНК *in vitro*, который находит все более широкое применение, является «ник-трансляция» [15, 37, 48, 50]. В этом случае сначала ДНК инкубируют с панкреатической ДНКазой I, под действием которой в ДНК образуются одноцепочечные разрывы. Затем ДНКазу инактивируют, а ДНК инкубируют с полимеразой I *E. coli* и натриевыми солями четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (один из которых является радиоактивным, обычно с меткой ^3H).

Реактивы и компоненты

Буфер трис — MgCl_2 : 0,05 М трис + 5 мМ MgCl_2 , pH 7,5. Готовят также в 10 раз более концентрированный буфер; после его разведения следует убедиться в правильности значения pH.

Бычья панкреатическая ДНКаза I (очищенная электрофоретически; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Ее растворяют в концентрации 1 мг/мл в 70 мМ буфере K_2HPO_4 — KH_2PO_4 , pH 7,4, содержащем 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (фракция V, Sigma, Che-

mical Co.) и 50% глицерина. Хранят при -20°C . Этот же буфер используют для разведения ДНКазы до 0,1 и 0,01 мг/мл.

ДНК-полимераза I *E. coli*. Ее разводят до 200 ед/мл в том же буфере, что и ДНКазу. Хранят при -20°C . В нашей лаборатории успешно использовались препараты, приобретенные у фирм Worthington Biochemical Corp. (Freehold, N. J) и Miles Biochemicals (Elkhart, Ind.).

Меченый тимидин-5'-трифосфат (ТТФ, тетранатриевая соль) поставляется в 50%-ном водном этаноле с концентрацией 0,5—1 мКи/мкл.

Обработка ДНКазой для получения ДНК с одноцепочечными разрывами

Для этой цели предпочтительна ДНК с высокой молекулярной массой, однако можно использовать и ДНК, выделенную с помощью гидроксилапатита. Важно, чтобы она была очень чистой. Обработку ДНКазами осуществляют следующим образом.

1. Исходный раствор ДНК (например, в буфере $0,1 \times \text{SSC}$) разбавляют до 0,2 мг/мл в буфере трис + MgCl_2 . Если концентрация исходного раствора около 0,2 мг/мл, добавляют в 10 раз более концентрированный буфер.

2. Добавляют по 10 мкл ДНКазы I (0,01 мг/мл) на каждый 1 мл раствора ДНК и инкубируют при 30°C 1—2 мин.

3. Инактивируют фермент, нагревая реакционный сосуд в водяной бане при 60°C в течение 10 мин. Растворы ДНК с одноцепочечными разрывами хранят при -20°C .

Методика

1. Радиоактивный нуклеозидтрифосфат наиболее устойчив при хранении в 50%-ном этаноле. Для предотвращения токсического влияния этанола на полимеразную реакцию вначале в реакционный сосуд добавляют меченый ТТФ, а затем перед добавлением остальных компонентов этанол выпаривают досуха в слабом токе N_2 .

Таблица 22.1. Состав смеси для проведения реакции в присутствии ДНК-полимеразы I

Компонент	Количество
³ H-тимидин-5'-трифосфат (New England Nuclear, Boston, Mass; выпаривают досуха перед добавлением остальных компонентов)	10—15 мкКи
ДНК с одицепочечными разрывами	50 мкл
Трис-буфер, 0,7 М, pH 7,8	10 мкл
MgCl ₂ , 0,14 М	5 мкл
Дитиоэритритол, 0,01 М (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)	5 мкл
Раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов, содержащий по 2 мМ каждого из следующих трифосфатов (Sigma Chemical Co.):	10 мкл
2-дезоксиаденозин-5'-трифосфат	
2-деоксицитидин-5'-трифосфат	
2-дезоксигуанозин-5'-трифосфат	
Тимидин-5'-трифосфат (Sigma Chemical Co.), 0,80 мМ	10 мкл
ДНК-полимераза I (Miles Biochemicals, Elkhart, Ind.), 200 ед/мл	10 мкл

2. Добавляют остальные компоненты, перечисленные в табл. 22.1.

3. Реакционную смесь (0,1 мл) инкубируют 2 ч при 30 °С.

4. Реакцию останавливают добавлением 10 мкл 10%-ного ДСН (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) и нагревают смесь в водяной бане при 60 °С в течение 10 мин.

5. Реакционную смесь пропускают через колонку с полиакриламидом (биогель P100, 100—200 меш; Bio-Rad Laboratories) размером 1×7,5 см, используя буфер 0,1×SSC, содержащий 0,1% ДСН. Отбирают фракции по 0,25—0,28 мл (14 капель на нашем коллекторе фракций равны 0,27 мл) и добавляют по 0,5 мл буфера 0,1×SSC, содержащего 30 мкг фрагментированной ДНК из спермы лосося на 1 мл каждой фракции. Фронтальная часть пика, соответствующая меченой ДНК, и «хвост» пика, соответствующий непрореагировавшему ³H-ТТР, элюируются приблизительно в тридцати фракциях.

6. На полоски фильтровальной бумаги Whatman № 1 (шириной 1,3 см) с интервалом 2,5 см наносят по 5 мкл каждой фракции элюата. Полоски высушивают, разрезают по отмеченным линиям, помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью и измеряют радиоактивность.

7. Отбирают фракции из фронтальной части пика и пропускают раствор через пресс Френча под давлением $11,2 \cdot 10^7$ Па. Меченая ДНК должна иметь удельную активность около $2 \cdot 10^5$ имп/мин·мкг и может быть разбавлена приблизительно до 2,6 мкг/мл в буфере $0,1 \times \text{SSC}$, содержащем 30 мкг/мл ДНК из спермы лосося.

8. Препарат разбавляют до активности 6000—8000 имп/мин·10 мкл с помощью буферного раствора, содержащего ДНК из спермы лосося (см. п. 5). Хранят при -20°C .

Замечания

Условия, необходимые для включения метки в ДНК *in vitro*, до некоторой степени произвольны, и успех порой зависит от случайности. Ниже дается несколько советов, которые помогут избежать некоторых наиболее часто встречающихся затруднений.

Перед введением метки препарат ДНК тестируют, используя ^3H -ТТР с низкой активностью. Разбавляют исходный ^3H -ТТР до 20 мкКи смесью этанол—вода (1 : 1, по объему) и вносят в реакционную смесь 10 мкл (0,2 мкКи) этого раствора (табл. 22.1). Готовят также контрольную пробирку с ДНК, заведомо способной включать ТТР. После инкубирования в течение 1—2 ч 25 мкл пробы обрабатывают 5—10%-ной ТХУ, собирают осадок на мембранном фильтре, определяют радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика и сравнивают с контролем. Оставшуюся часть пробы пропускают через колонку с биогелем P100 (см. выше), собирают фракции 4—14 во флаконы Bio-vials (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.) и измеряют радиоактивность в сцинтилляционном счетчике, используя подходящую сцинтилляционную жидкость для водных образцов. Максимальная активность фронтальной части пика должна быть во фракциях 5 или 6. От 30 до 50% добавленного ^3H -ТТР должно быть включено в

ДНК, осаждаемую ТХУ. Меченую ДНК высокого качества элюируют при гель-фильтрации в виде острого пика с крутым фронтом. Радиоактивность во фракциях 9—12 составляет менее 5% радиоактивности во фракциях 5—6. Она соответствует осаждающимся ТХУ коротким фрагментам ДНК, не образующим двухцепочечных комплексов.

Препараты ДНКазы из различных партий и источников имеют разные активности, поэтому ДНКазу предварительно титруют, инкубируя ее 10-мкл аликвоты, имеющие различную концентрацию (например, 0,1 и 0,01 мг/мл) с 1 мл ДНК в течение различных периодов времени и определяя максимальное включение метки.

Включение ^3H -ТТФ в основном зависит от качества ДНК. Присутствие в лизатах эндогенной ДНКазы может приводить к появлению большого числа одноцепочечных разрывов в ДНК. Если в ДНК нет разрывов, вызванных действием эндогенной ДНКазы, то без предварительной обработки ДНКазой (см. выше) включается лишь небольшое количество ТТР. Если же ДНК имеет достаточное число разрывов, то ТТР включается одинаково как после обработки ДНКазой, так и без нее. Иногда обработка ДНКазой приводит к образованию слишком большого числа разрывов, в результате чего появляются короткие фрагменты меченой ДНК (см. выше). Поэтому каждый препарат ДНК следует тестировать дважды: с обработкой и без обработки ДНКазой. Это позволяет определить количество включенного ТТР и качество меченого материала, как описано выше.

Регулируют включение ТТР путем изменения концентрации немеченого ТТР. Например, если включение ^3H -ТТР в ДНК, не обработанную ДНКазой, составляет лишь 15—20%, но качество его хорошее, а качество продукта из обработанной ДНКазой части того же образца низкое, то следует использовать не обработанный ДНКазой препарат и снизить концентрацию ТТР до 0,4 мМ (табл. 22.1).

22.6.4. Метод реассоциации в растворе

Реассоциацию фрагментов денатурированной ДНК в растворе можно измерить оптически с помощью регистрирующего спектрофотометра. Если ДНК обладает

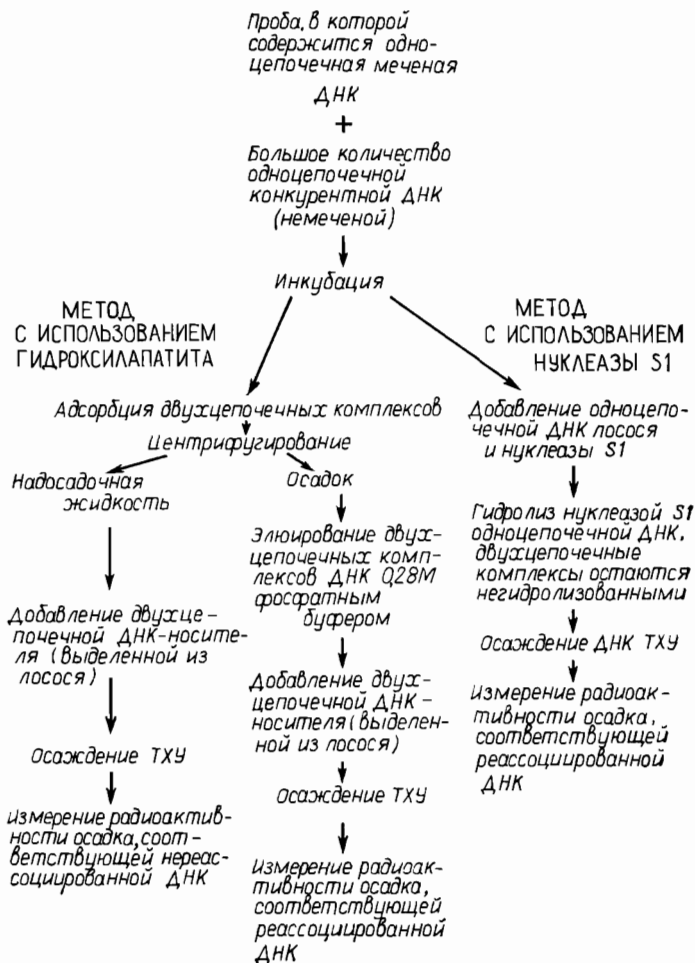


Рис. 22.8. Схема метода изучения гомологии ДНК в растворе с использованием гидроксилапатита и нуклеазы S1.

радиоактивностью, последнюю можно измерить по адсорбции на гидроксилапатите или по устойчивости к нуклеазе S1. Общая схема этих методик представлена на рис. 22.8. Обе они предусматривают инкубацию ме-

ченной ДНК с высокой удельной активностью (в очень малом количестве) с большим избытком фрагментов немеченой ДНК. Удельная активность должна составлять от $5 \cdot 10^4$ до $2,5 \cdot 10^5$ имп/мин · мкг, а концентрации ДНК должны быть ниже 5 мкг/мл.

Предварительные процедуры

Немеченая ДНК. И для разделения на гидроксилпатите, и для реакции с нуклеазой S1 немеченую ДНК готовят одинаково следующим образом.

1. Исходный препарат ДНК (разд. 22.2.2) разбавляют приблизительно до 0,9—1,0 мг/мл.

2. Каждый препарат обрабатывают ультразвуком дважды по 30 с (мы, например, используем ультразвуковой дезинтегратор Biosonic III с датчиком на 0,375 дюймов (9,5 мм) и настройкой энергии на 60 делений).

3. Денатурируют ДНК и гидролизуют примесь РНК, добавляя 5 н. NaOH до конечной концентрации 0,25 н. Нагревают до 50°C в течение 15 мин, охлаждают и нейтрализуют эквивалентным количеством HCl.

4. Проводят диализ препаратов против буферного раствора 0,02 М NaCl + 10^{-3} М NEPES, pH 7,0, и доводят концентрацию ДНК до 0,6 мг/мл.

Меченая ДНК. Для реализации обеих методик требуется небольшое количество денатурированной меченой ДНК с высокой удельной радиоактивностью и большим избыток денатурированной немеченой ДНК. Удельная активность должна составлять от $0,5 \cdot 10^5$ до $2,5 \cdot 10^5$ имп/мин · мкг, а концентрация ДНК ≤ 5 мкг/мл.

Титрование нуклеазы S1. Ферментативную активность исходной нуклеазы S1 (Calbiochem-Behring, La Jolla, Calif.) определяют следующим образом.

1. Препарат фрагментированной денатурированной бактериальной ^3H -ДНК в концентрации 0,6 мкг/мл, растворенный в буферном растворе 0,02 М NaCl + 1 мМ NEPES, pH 7,0, вносят по 50 мкл в несколько полипропиленовых пробирок (12×75 мм), содержащих по 1 мл буфера (0,05 М ацетат натрия + 0,3 М NaCl + 0,5 мМ ZnCl_2 , pH 4,6; модификация буфера А Фогта [57]).

2. Добавляют по 50 мкл двойных разведений нуклеазы S1. Для разведения используют буфер 0,02 М

NaCl + 1 мМ НЕРЕС, рН 7,0. Пробирки инкубируют в течение 1 ч при 50 °С.

3. Добавляют 30 мкг фрагментированной нативной ДНК из спермы лосося (50 мкл при концентрации 0,6 мг/мл), осаждают ТХУ (конечная концентрация 5%), осадок собирают на нитроцеллюлозном фильтре и измеряют радиоактивность.

Измеряют степень гомологии, используя разведение фермента с концентрацией, в два раза превышающей концентрацию, которая необходима для полного гидролиза 30 мкг ДНК. Исходный препарат фермента разбавляют таким образом, чтобы его хватило для осуществления одного опыта. Исходную нуклеазу S1 титруют каждые 6 мес и хранят при —20 °С.

Смесь для реассоциации. В начале эксперимента нагревают нужное количество меченой ДНК в кипящей водяной бане в течение 5 мин, а затем охлаждают льдом. Дают возможность препарату нагреться до комнатной температуры и разливают порциями по 10 мкл. При этом температуру поддерживают постоянной, для того чтобы избежать колебания объема проб. Реакционную смесь, состав которой приведен ниже, разносят по пробиркам (6×22 мм).

Меченая ДНК	10 мкл
Буферный раствор 0,88 М NaCl + 10 ⁻³ М НЕРЕС, рН 7,0	50 мкл
Конкурентная ДНК, 0,6 мг/мл (яли нативная ДНК лосося, 0,6 мг/мл)	50 мкл
Общий объем	110 мкл

В две контрольные пробирки вносят фрагментированную нативную ДНК из спермы лосося (не имеющую гомологии с бактериальной ДНК) для измерения степени саморенатурации меченых фрагментов. Четыре пробирки используют для гомологичной реассоциации и две — для каждого из препаратов гетерологичных ДНК. Пробирки инкубируют в течение 20—24 ч при температуре на 25 °С ниже T_m ДНК-стандарта (T_m определена в буфере SSC). После инкубации из каждой пробирки отбирают по 100 мкл препарата для определения степени реассоциации с помощью гидроксипатита или нуклеазы S1 (см. ниже).

Методика с гидроксилapatитом

Эта методика дает возможность путем избирательной адсорбции на гидроксилapatите (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.) отделять двухцепочечную ДНК от одноцепочечной. Двухцепочечная ДНК адсорбируется на гидроксилapatите в 0,14 М фосфатном буфере, в то время как одноцепочечная не адсорбируется [11]. Различные партии гидроксилapatита отличаются по адсорбционной емкости, поэтому иногда требуется испытать не одну партию.

1. 0,5 г гидроксилapatита вносят в пробирку (13×100 мм), добавляют 3,0 мл 0,14 М фосфатного буфера (эквивалентные количества NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4), содержащего 0,4% ДСН; гидроксилapatит суспендируют с помощью встряхивателя Vortex и нагревают пробирку при 60°C в водяной бане.

2. Добавляют 100 мкл реакционной смеси, перемешивают во встряхивателе Vortex и снова ставят в водяную баню.

3. Пробирку центрифугируют 3—4 мин при 5000 об/мин, сливают буфер в пробирку размером 18×150 мм и добавляют к гидроксилapatиту еще 3 мл 0,14 М фосфатного буфера. Вновь нагревают, перемешивают, центрифугируют и сливают надосадочную жидкость в пробирку, в которой находится первый центрифугат.

4. Добавляют к гидроксилapatиту 3 мл 0,28 М фосфатного буфера, перемешивают и центрифугируют. Декантируют надосадочную жидкость во вторую пробирку. К гидроксилapatиту добавляют еще 3 мл буфера, перемешивают, центрифугируют и надосадочную жидкость сливают в ту же пробирку.

5. В каждую пробирку добавляют 30 мкг ДНК-носителя (50 мкл ДНК из спермы лосося в концентрации 0,6 мг/мл) и перемешивают. Добавляют ТХУ до конечной концентрации 5% и еще раз хорошо перемешивают с помощью встряхивателя Vortex. Охлаждают в холодильнике в течение 1 ч.

6. Осадки собирают на нитроцеллюлозных фильтрах, фильтры высушивают, помещают в сцинтилляционные флаконы и измеряют радиоактивность.

7. Сумма импульсов в двух сцинтилляционных флаконах представляет собой общее количество импульсов в минуту в реакционном сосуде. Число импульсов в минуту в первом сцинтилляционном флаконе соответствует количеству импульсов в минуту нерассоциированной ДНК, а во втором — reassoциированной ДНК.

Степень гомологии определяют, разделив значение радиоактивности, полученное при гетерологичной reassoциации, на величину радиоактивности, полученной при гомологичной reassoциации, и умножив результат на 100. В табл. 22.2 приводится пример подобных расчетов.

Бреннер и др. [11] описали эффективную методику, по которой на гидроксилapatите фракционируют большие количества ДНК.

Методика с нуклеазой S1

При тщательно контролируемых условиях нуклеаза S1 гидролизует одноцепочечную ДНК и оказывает слабое действие на двухцепочечную ДНК [17]. Следовательно, степень комплементарности между фрагментами меченой ДНК и избытком фрагментов немеченой ДНК можно определить, измерив количество ДНК, устойчивой к нуклеазе S1 (т. е. осаждаемой ТХУ), по радиоактивности.

1. 100 мкл образца из каждой пробирки с реакционной смесью вносят в полипропиленовую пробирку (12×75 мм), содержащую 1 мл буферного раствора 0,05 М ацетат натрия + 0,3 М NaCl + 0,5 мМ ZnCl₂, pH 4,6, и 50 мкл денатурированной фракционированной ДНК из спермы лосося с концентрацией 0,5 мг/мл. Содержимое пробирки перемешивают с помощью встряхивателя Vortex и затем добавляют к нему 50 мкл нуклеазы S1. Смесь вновь перемешивают и инкубируют в водяной бане при 50°C в течение 1 ч.

2. Пробирки вынимают из водяной бани, добавляют равные объемы 10%-ной ТХУ, хорошо перемешивают с помощью встряхивателя Vortex и охлаждают в холодильнике в течение 1 ч.

3. Осадок собирают на нитроцеллюлозном фильтре. Фильтр сушат, помещают в сцинтилляционный флакон и измеряют радиоактивность. При этом выявляются только фрагменты ДНК, устойчивые к нуклеазе S1.

Таблица 22.2. Гипотетические примеры расчетов степени гомологии ДНК (%), определенной по методу реассоциации в растворе с использованием гидроксилпатита и нуклеазы S1

Методика с гидроксилпатитом

Сосуд с реакционной смесью	Неадсорбированная радиоактивность, имп/мин	Адсорбированная радиоактивность, имп/мин	Адсорбированная радиоактивность, %	Адсорбированная радиоактивность, чистые %	Степень гомологии, %
Только фрагменты меченой ДНК	900	100	10	—	—
Гомологичная реассоциация	100	900	90	80	100
Гетерологичная реассоциация	400	600	60	50	62

Методика с нуклеазой S1

Сосуд с реакционной смесью	Радиоактивность ДНК, устойчивой к нуклеазе S1, имп/мин	Радиоактивность ДНК, устойчивой к нуклеазе S1, чистые имп/мин	Степень гомологии, %
Только фрагменты меченой ДНК	100	—	—
Гомологичная реассоциация	900	800	100
Гетерологичная реассоциация	600	500	62

Степень гомологии определяют, разделив число импульсов в минуту гетерологичной устойчивой к нуклеазе S1 ДНК на число импульсов в минуту гомологичной устойчивой к нуклеазе S1 ДНК и умножив результат на 100. Пример подобных расчетов приведен в табл. 22.2.

Методика, основанная на сравнении термостабильности

Степень некомплементарности пар азотистых оснований можно определить, сравнивая термостабильность гетерологичных двухцепочечных комплексов с термостабильностью гомологичных двухцепочечных комплексов. Уменьшение количества меченой устойчивой к нуклеазе S1 ДНК определяют в процессе постепенного нагре-

вания реассоциированной ДНК в водяной бане вплоть до температуры денатурации. Реассоциацию проводят обычным способом, используя, однако, при этом большие объемы реакционных смесей. Ниже представлен состав реакционных смесей, которые готовят в пробирках размером 13×100 мм с завинчивающимися крышками.

Меченая ДНК	0,12 мл
Немеченая ДНК	0,60 мл
Буферный раствор 0,88 М NaCl+10 ⁻³ М HEPES	0,60 мл
Общий объем	1,32 мл

1. Пробирки инкубируют в течение 20—24 ч при температуре на 25°C ниже T_m меченой ДНК (определенной в буфере SSC).

2. Пробирки охлаждают до комнатной температуры и добавляют 1,32 мл 50%-ного (по объему) раствора формамида в дистиллированной воде.

3. Пробирки помещают в циркулирующую водяную баню, уровень воды в которой должен быть чуть ниже крышек пробирок во избежание изменения концентрации компонентов в пробирках за счет испарения и конденсации жидкости на стенках пробирок.

4. Определение термостабильности начинают при 45°C и выдерживают пробирки при этой температуре в течение 5 мин. Затем отбирают пробу 200 мкл, вносят ее в пробирку, содержащую 1,0 мл буферного раствора ацетат + NaCl + ZnCl₂, pH 4,6 (см. выше методику с гидроксилпатитом), и вновь помещают пробирку с реакционной смесью в водяную баню. Отбирают пробу стандартной пипеткой или микропипеткой с положительным вытеснением (другие микропипетки не обеспечивают точных результатов из-за колебаний температуры).

5. Температуру водяной бани повышают на 5°C и в течение 5 мин ждут, пока она установится. Еще через 5 мин отбирают следующую пробу. Продолжают таким образом до 90°C — всего отбирают 10 проб.

В пробы вносят нуклеазу S1 (см. методику с нуклеазой S1). Число импульсов в минуту устойчивой к нуклеазе S1 ДНК откладывают против температуры. Температуру, при которой 50% двухцепочечных комплексов становятся чувствительными к нуклеазе S1

(т. е. диссоциируют), обозначают $T_{m(i)}$ (необратимое разделение цепей, индекс i от англ. irreversible — необратимый). Разницу между $T_{m(i)}$ для гомологичных и гетерологичных цепей обозначают $\Delta T_{m(i)}$. Количество ошибочно связанных пар азотистых оснований, приходящихся на каждый градус Цельсия $\Delta T_{m(i)}$, варьирует от 1 до 2,2%.

Определение значений C_0t

Начальная реассоциация цепей ДНК в растворе происходит по типу кинетики второго порядка [1, 6, 12, 19, 59]. Скорость реассоциации является функцией величины генома; ее используют для определения его размера. Обычно уравнение реакции 2-го порядка [уравнение (1)] можно преобразовать [уравнение (2)] для получения так называемых кривых C_0t [12].

$$1/C - 1/C_0 = kt, \quad (1)$$

$$C/C_0 = 1/(1 + kC_0t), \quad (2)$$

где C — концентрация одноцепочечной ДНК в момент времени t в молях нуклеотидов на 1 л; C_0 — концентрация одноцепочечной ДНК в нулевой момент времени в молях нуклеотидов на 1 л; t — время в секундах, а k — константа скорости реассоциации.

Количество молей нуклеотидов на 1 л равно частному от деления количества ДНК в мг/мл на 331 мг ДНК на ммоль нуклеотидов. Единица ммоль/мл равна моль/л (М). Уравнение (2) соответствует гиперболической кривой, описываемой общей формулой

$$y = 1/(1 + ax). \quad (3)$$

Если в уравнении (3) $y = 1/2$, то $x = 1/a = x_{1/2}$, а $a = 1/x_{1/2}$. При откладывании на графике логарифмов значений x при $y = 1/2$ получаем $\lg a = \lg 1/x_{1/2} = -\lg x_{1/2}$. В общем виде логарифмическая кривая для $\lg C_0t$ представлена на рис. 22.9. Участок кривой, соответствующий изменению абсциссы приблизительно на два логарифма, является почти линейным. Это объясняется тем, что любое существенное изменение величины C/C_0 происходит в интервале от $1/(1+0,1)$ до $1/(1+10)$, т. е. при значениях

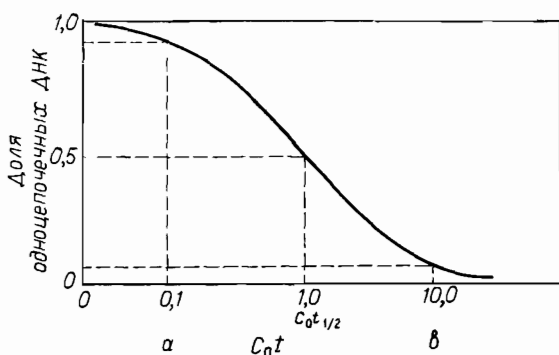


Рис. 22.9. Обобщенная кривая C_0t . При значениях $C_0t \leq a$ значения $1/(1+C_0t)$ равны или превышают 0,9. Если $C_0t \geq b$, значения $1/(1+C_0t) < 0,1$.

kC_0t , варьирующем от 0,1 до 10. Константа скорости $k = 1/C_0t_{1/2}$, а ее размерность $\text{моль}^{-1} \text{т}^{-1}$.

Денатурированная ДНК в растворе может реассоциировать при значениях kC_0t намного выше 10, поэтому значение точного времени инкубации или точных концентраций фрагментов ДНК определять не обязательно. Однако при определении значений $C_0t_{1/2}$ эти параметры необходимы, так как в этом случае определяют ряд точек между $kC_0t = 0,1$ и $kC_0t = 10$. На практике значения C_0t для бактериальных ДНК варьируют приблизительно от 0,1 до 50. Изменяя время инкубации и концентрацию немеченой ДНК или и то и другое вместе, можно получить отдельные значения C_0t . В табл. 22.3 приведены значения C_0t для четырех различных концентраций ДНК и восьми различных времен инкубации.

Набор смесей для реассоциации готовят обычным способом (разд. 22.6.4 «Предварительные процедуры») по две пробирки для каждой концентрации ДНК и каждой температуры. После завершения инкубации одной серии смесей пробирки помещают в морозильник до окончания инкубации всех остальных серий. Степень образования двухцепочечных комплексов определяют с помощью гидроксилпатита или нуклеазы S1 (разд. 22.6.4).

Таблица 22.3. Значения C_0t для различных концентраций ДНК и времен реассоциации

Немеченая ДНК			Время		
мкг/110 мкл	эквивалент, мгк/мл	эквивалент, моль/л	ч	с	$C_0 t$
1	9,1	$0,27 \cdot 10^{-4}$	0,5	$1,8 \cdot 10^3$	0,049
5	45	$1,37 \cdot 10^{-4}$	0,5		0,247
20	182	$5,49 \cdot 10^{-4}$	0,5		0,99
30	272	$8,24 \cdot 10^{-4}$	0,5		1,48
1			1,0	$3,6 \cdot 10^3$	0,097
5			1,0		0,49
20			1,0		1,98
30			1,0		2,97
1			2,0	$7,2 \cdot 10^3$	0,194
5			2,0		0,986
20			2,0		3,95
30			2,0		5,93
1			4,0	$1,44 \cdot 10^4$	0,388
5			4,0		1,97
20			4,0		7,90
30			4,0		11,9
20			8,0	$2,88 \cdot 10^4$	15,8
30			8,0		23,7
20			16	$5,76 \cdot 10^4$	31,6
30			16		47,5
20			20	$7,20 \cdot 10^4$	39,5
30			20		59,3
20			24	$8,64 \cdot 10^4$	47,4
30			24		71,2

Долю фрагментов ДНК, несорбирующихся гидроксил-апатитом или чувствительных к нуклеазе S1, откладывают по оси y , а значения C_0t — по оси x в логарифмическом масштабе.

Если количество двухцепочечных комплексов измеряют с помощью гидроксил-апатита, то константу скорости k вычисляют по уравнению (2). Однако результаты, полученные по методике с нуклеазой S1, не отражают кинетику 2-го порядка, поскольку при этом гидролизуются концы двухцепочечных фрагментов. Отношение между этими двумя процедурами можно

представить следующим образом:

$$\frac{S}{C_0} = [1/(1 + kC_0t)]^{0,45}, \quad (4)$$

где S — концентрация ДНК, чувствительной к нуклеазе $S1$ [54]. Уравнение (4) можно преобразовать:

$$[S/C_0]^{2,22} = 1/(1 + kC_0t). \quad (5)$$

Если на графике откладывают результаты, полученные с применением нуклеазы $S1$ по уравнению (5), то получают кривую C_0t , сравнимую с кривой, получаемой при использовании гидроксилата. Важно также помнить, что на скорость реассоциации сильно влияет ионная сила, поэтому сравнивать результаты можно лишь при одинаковой ионной силе растворов.

Дополнительная информация, касающаяся кинетики реассоциации и кривых C_0t , содержится в работах [1, 12, 19, 51, 59].

22.6.5. Мембранные методы

Мембранный метод определения гомологии ДНК отличается от метода реассоциации в растворе тем, что немеченая ДНК иммобилизуется на нитроцеллюлозном фильтре. Общая схема этого метода приведена на рис. 22.10.

Предварительные процедуры

Иммобилизацию ДНК на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах и приготовление конкурентной ДНК можно провести за несколько месяцев до эксперимента, в то время как предынкубация мембраны является частью самого эксперимента.

Приготовление конкурентной ДНК

1. Препарат ДНК (2 мг/мл в буфере $0,1 \times SSC$ или $0,02 \text{ M NaCl} + 10^{-3} \text{ M HEPES}$, pH 7,0) дважды пропускают через пресс Френча ($11,2 \cdot 10^7 \text{ Па}$) или обрабатывают ультразвуком (разд. 22.6.4 «Предварительные процедуры»).

МЕТОД ПРЯМОГО СВЯЗЫВАНИЯ

МЕТОД, ОСНОВАННЫЙ НА
КОНКУРЕНЦИИ

Проба, содержащая одноцепочечную меченую ДНК

Проба, содержащая одноцепочечную меченую ДНК

+
Большое количество одноцепочечной конкурентной ДНК

связывание с мембранным фильтром,
содержащим одноцепочечную ДНК
(немеченую)

Инкубация

Отмывка мембранного фильтра
(двухцепочечные комплексы ДНК
остаются связанными с ним)

Высушивание мембранного фильтра
и измерение радиоактивности

Рис. 22.10. Схема методов изучения гомологии ДНК с помощью прямого связывания и конкуренции.

2. ДНК денатурируют нагреванием в кипящей бане в течение 5 мин, после чего раствор ДНК быстро охлаждают, помещая пробирку в лед.

3. Денатурированную ДНК диализуют до равновесного состояния против охлажденного буфера $2,2 \times \text{SSC}$.

4. Доводят концентрацию ДНК до 1,5 мг/мл, добавляя буфер $2,2 \times \text{SSC}$.

Если препараты ДНК имеют значительные примеси РНК или отличаются высоким мол. процентом (G+C), их денатурируют с помощью NaOH (разд. 22.6.4 «Предварительные процедуры»).

Иммобилизация ДНК на мембране. Ниже приводится методика Джиллесли и Спигелмана [28], адаптированная применительно к нитроцеллюлозному мембранному фильтру BA 85 диаметром 15 см (Schleicher and Schuell Co., Keene, N. H.) с рабочей фильтрующей поверхностью около 173 см². При иммобилизации 4,35 мг ДНК на каждый квадратный сантиметр приходится 25 мкг ДНК. Если размер мембраны меньше, соответственно изменяют количества ДНК и буфера.

1. 4,35 мг ДНК разбавляют буфером $0,1 \times \text{SSC}$ (≈ 90 мл) до концентрации 50 мкг/мл.

2. ДНК денатурируют, нагревая раствор (в 125-мл колбе Эрленмейера) в кипящей бане в течение 10 мин, затем быстро охлаждают его, вливая в 800 мл буфера $6 \times \text{SSC}$, охлажденного во льду (для получения концентрации ДНК около 5 мкг/мл).

3. Нитроцеллюлозный фильтр диаметром 15 см медленно кладут на поверхность дистиллированной воды таким образом, чтобы его поры заполнились водой (если мембрану погрузить сразу, образуются воздушные пузыри, которые препятствуют равномерной фильтрации).

4. Мокрый мембранный фильтр кладут на держатель (разд. 22.6.1) и промывают мембрану 500 мл холодного буфера $6 \times \text{SSC}$ при скорости потока ~ 30 мл/мин. Затем денатурированную ДНК пропускают через фильтр и снова промывают 500 мл буфера $6 \times \text{SSC}$.

5. Мембрану высушивают при комнатной температуре, а затем в течение ночи при 60°C .

6. На краю мембраны делают пометку карандашом, разрезают фильтр на 2 половины, отделяют одну от другой половиной кусочка бумаги, которой мембраны были переложены в упаковочной коробке, и помещают их в конверт. Хранят в эксикаторе над CaSO_4 при комнатной температуре.

Мембраны берут за внешний край, избегая касания к той поверхности, на которой находится ДНК. Из большого мембранного фильтра вырезают маленькие диски в основном на центральных участках.

Предынкубация мембран, содержащих ДНК

Смесь Денхардта для предынкубации [21] содержит следующие компоненты, растворенные в буфере $2 \times \text{SSC}$:

Бычий сывороточный альбумин (фракция V, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)	0,02%
Поливинилпирролидон (Calbiochem-Behring, La Jolla, Calif.)	0,02%
Фикол 400 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)	0,02%

1. Из мембраны диаметром 15 см вырезают пробойником мембраны размером 3×9 мм (разд. 22.6.1).

2. Мембраны предынкубируют в течение 0,5—2 ч при температуре, используемой в эксперименте. В процессе инкубации мембраны несколько раз встряхивают.

3. Мембраны выкладывают на бумажное полотенце для удаления избыточной жидкости, а затем вносят их в реакционные смеси.

Метод

прямого связывания

С помощью метода прямого связывания количественно определяют способность меченой ДНК образовывать двухцепочечные комплексы с цепями ДНК, иммобилизованной на мембранных фильтрах. Для обеспечения значительной степени реассоциации с иммобилизованной ДНК необходимы большие, чем в случае метода реассоциации в растворе, количества меченой ДНК. Поэтому обычно используют препараты ДНК с низкой удельной активностью (2 000—10 000 имп/мин $\times$ мкг). Реакционные смеси содержат:

Меченую ДНК (50—100 мкг/мл)	10 мкл
Буфер 2,2 $\times$ SSC	100 мкл

1. Предынкубируют необходимое количество мембранных фильтров, содержащих ДНК, и хранят мембраны разных типов отдельно.

2. Готовят реакционные смеси и перемешивают их с помощью встряхивателя Vortex.

3. Мембраны помещают в пробирки, закрывают их пробками и инкубируют при температуре на 25 °C ниже T_m меченой ДНК (определенной в буфере SSC). Инкубация продолжается 12—15 ч.

4. Мембраны извлекают из пробирок и помещают в промывную камеру (рис. 22.4, В и 22.5). Промывают

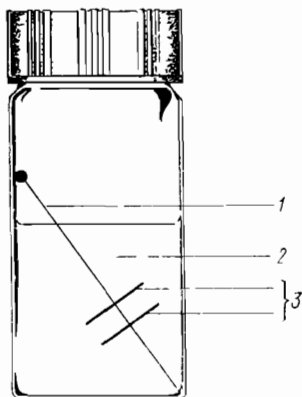


Рис 22.11. Флакон для определения радиоактивности на мембранных фильтрах.

- 1 — булавка;
2 — смесь на основе толуола;
3 — фильтры, насаженные на булавку.

дважды по 5 мин в двух объемах (300 мл) буфера $2 \times \text{SSC}$ при температуре инкубации. Во время промывания камеру периодически двигают взад и вперед для обеспечения потока буфера между ячейками. Мембранные фильтры вынимают и сушат на бумажном полотенце под лампой накаливания.

5. Мембраны насаживают на булавку, как показано на рис. 22.11.

6. Булавки с мембранами вносят в сцинтилляционные флаконы (рис. 22.11) и измеряют радиоактивность.

Поскольку мембранные фильтры с ДНК отличаются друг от друга, прямые измерения не обеспечивают высокой точности. Так же как в методике с нуклеазой S1 (табл. 22.2), число импульсов для мембраны с гетерологичной ДНК делят на число импульсов для мембраны с гомологичной ДНК. Умножив это отношение на 100, получают процент гомологии.

Методика определения термостабильности

1. Проводят процедуру прямого связывания ДНК, включая промывание (п. 4).

2. Извлекают мембранные фильтры из камеры для промывания и насаживают их на булавку ближе к головке. Булавку вкалывают в резиновую пробку (рис. 22.7), закрывающую трубку и помещают в первую пробирку для элюирования. Если фильтров несколько, их отделяют друг от друга тефлоновыми дисками.

3. Пробирки для элюирования размером 13×100 мм, содержащие 1,2 мл буфера $0,5 \times \text{SSC}$, ставят в водяную баню и проводят постепенное элюирование двухцепочечных комплексов, увеличивая температуру бани на 5°C через каждые 10 мин. В конце каждого 10-мин периода фильтры переносят в другую пробирку для элюирования и повышают температуру на 5°C . Профиль элюирования начинают определять при температуре приблизительно на 10°C ниже температуры, при которой осуществлялось прямое связывание. Устанавливают 9 разных температур элюирования и определяют радиоактивность на фильтрах (т. е. 10 сцинтилляционных флаконов на каждую кривую термостабильности).

4. Сливают содержимое каждой пробирки для элюирования в сцинтилляционный флакон и промывают пробирку 0,5 мл буфера $0,5 \times \text{SSC}$, сливая раствор после промывания в сцинтилляционный флакон.

5. Добавляют 10 мл сцинтилляционного раствора с тритоном X-100 (3 части сцинтилляционного раствора толуола и 2 части сцинтилляционного раствора с тритоном X-100) в каждый флакон, перемешивают и измеряют радиоактивность.

Интегральные кривые элюирования получают, суммируя значения радиоактивности при каждой температуре и разделив результат на общую радиоактивность (т. е. подсчитывают среднее значение для 10 образцов). Хотя эти кривые обратны по отношению к кривым, полученным методом реассоциации в растворе, значения $T_m(1)$ могут быть определены тем же способом.

Для определения профиля термостабильности с помощью автоматической пипетки заливают по 1,2 мл буфера $0,5 \times \text{SSC}$ одновременно во все пробирки Вассермана. Одну пробирку для элюирования ставят в водяную баню раньше других для предварительного нагревания. В дополнительную пробирку помещают термометр и отмечают точную температуру в середине и в конце каждого температурного интервала.

Методика, основанная на конкуренции

В этой методике используют фрагменты немеченой денатурированной ДНК, конкурирующие с денатурированной меченой ДНК при образовании двухцепочечных комплексов ДНК, связанных с мембранным фильтром. Препарат-конкурент содержит 1,5 мг/мл ДНК в буфере $2,2 \times \text{SSC}$; его добавляют в реакционную смесь в количестве 75 или 150 мкг. Объемы различных реакционных смесей указаны в табл. 22.4. Данная методика сходна с процедурой прямого связывания, за исключением того, что во всех реакционных пробах используется один и тот же вид фильтра с ДНК, а вид и количество конкурентной ДНК различны. Для каждого объема конкурентной ДНК используют две пробирки и ставят 6 проб без конкурентной ДНК в нулевой точке.

Для определения процента гомологии величину подавления связывания за счет фрагментов гетерологич-

Таблица 22.4. Состав реакционных смесей для определения конкуренции при изучении гомологии ДНК мембранным методом

Добавляемый компонент	Количество конкурентной ДНК		
	0	75 мкг	150 мкг
Меченая ДНК (50—100 мкг/мл)	10 мкл	10 мкл	10 мкл
Конкурентная ДНК в буфере $2,2 \times \text{SSC}$	—	50 мкл	100 мкл
Буфер $2,2 \times \text{SSC}$	100 мкл	50 мкл	—
Общий объем	110 мкл	110 мкл	110 мкл

Таблица 22.5. Гипотетический пример расчетов процентов гомологии ДНК в процедуре определения конкуренции при использовании мембранного метода

	Имп/мин	Подавление, имп/мин	Гомология, %
Прямое связывание без конкурента	1000	—	—
Гомологичный конкурент (75 мкг)	120	880	100
Гомологичный конкурент (150 мкг)	90	910	100
Гетерологичный коконкурент (75 мкг)	400	600	$(600/880) \cdot 100 = 68$
Гетерологичный конкурент (150 мкг)	380	620	$(620/910) \cdot 100 = 68$

ной немеченой ДНК делят на величину подавления за счет фрагментов гомологичной немеченой ДНК при каждой концентрации конкурента и результат умножают на 100. Пример подобных расчетов приведен в табл. 22.5.

22.7. ГОМОЛОГИЯ РНК

Методика определения гомологии рРНК отличается от методик определения гомологии ДНК, так как с РНК комплементарно взаимодействует только небольшая фракция (0,1—0,3%) всей ДНК. Поскольку РНК комплементарна лишь одной из цепей ДНК, молекулы РНК не связываются комплементарно друг с другом. Главным требованием при проведении опытов с РНК являет-

ся отсутствие РНКазы на фильтрах и стеклянной посуде. В данном разделе описаны методики прямого измерения связывания меченой РНК с ДНК, иммобилизованной на мембранных фильтрах, или непрямого определения конкуренции при связывании. Дополнительная информация по методикам и интерпретации результатов содержится в работах [9—11, 20, 26, 28, 29, 36].

22.7.1. Предварительные процедуры

Как и при определении гомологии ДНК мембранным методом, перед использованием аналогичного метода для РНК проводят ряд подготовительных процедур.

Очистка стеклянной посуды и буферов от РНКазы [22]

Всю стеклянную посуду прокаливают в муфельной печи или в печи для стерилизации сухим жаром. Пластмассовую посуду автоклавируют, погружая ее в 0,1%-ный детергент (например, изоклин, Isolabs Co., Akron, Ohio). Все буферы автоклавируют и обрабатывают 0,2%-ным диэтилпирокарбонатом (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.).

Приготовление меченой РНК

Методика введения метки в рРНК очень похожа на аналогичную процедуру для ДНК (разд. 22.6.2). В качестве предшественников при включении метки в РНК *in vivo* используют обычно ^{14}C - или ^3H -урацил или уридин или $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$. В течение последних 30 мин инкубационного периода часто создают большой (100-кратный) избыток немеченого предшественника для снижения удельной активности мРНК. Меченую РНК выделяют так же, как немеченую (разд. 22.3). В молекулы РНК можно также ввести *in vitro* ^{125}I (разд. 22.6.3).

Фракционирование РНК

Поскольку существует несколько классов РНК, меченую (ые) РНК, предназначенную для экспериментов по гибридизации, обычно отделяют от остальных. Хотя

можно выделить рибосомы, разделить их на субчастицы и затем выделить из них рРНК, обычно фракционируют суммарную РНК и разделяют РНК разных типов методом электрофореза в полиакриламидном геле [8, 24, 40, 53] или центрифугированием в градиенте сахарозы [46]. 23S-рРНК фракционируют центрифугированием в градиенте сахарозы 5—20%, приготовленном в буфере $1 \times \text{SSC}$. Фракционирование 16S-рРНК может осложняться за счет соосаждения продуктов деградации 23S-рРНК.

Конкурентная РНК

Исходные препараты РНК разбавляют до концентрации 1 мг/мл буфером $0,1 \times \text{SSC} + 10^{-3} \text{ M}$ NERPES , pH 7,0. Пробы нагревают в течение 5 мин в кипящей водяной бане, быстро охлаждают во льду и хранят при -80°C .

Иммобилизация ДНК и предынкубация мембран, содержащих ДНК

ДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах, как описано в разд. 22.6.5 «Предварительные процедуры». Используют автоклавирование и обработку буферов диэтилпирокарбонатом; если препараты ДНК содержат примеси РНКазы, то их обрабатывают перед денатурацией диэтилпирокарбонатом или протеолитическими ферментами. Продолговатые фильтры размером 3×9 мм или круглые с диаметром 10 мм предынкубируют в смеси Денхардта. Используют буферы, не содержащие РНКазу.

Недавно были иммобилизованы фрагменты или молекулы ДНК и РНК путем их ковалентного присоединения к диазобензилоксиметилированной бумаге [7, 55]. Иммобилизованная таким способом ДНК может быть очень полезна в экспериментах, основанных на сравнении термостабильности. Эту бумагу можно приобрести у двух фирм (Enzobond, Enzo Biochemicals, Inc., New York, N. Y., Schleicher and Schuel Co., Keene, N. H.).

Инструкции по использованию бумаги высылаются обеими фирмами.

Применение формамида

Формамид является лучшим растворителем для снижения температур денатурации двухцепочечных комплексов ДНК и гибридов РНК — ДНК. При более низких температурах денатурации снижается степень термической деградации нуклеиновых кислот. В буферах, содержащих от 0,035 до 0,88 М NaCl, на каждый процент формамида T_m ДНК снижается на 0,60 °C [34]. Для гибридизации рРНК на фильтре Джиллеспии и Джиллеспии [29] применяли 50%-ный формамид в буфере $6 \times \text{SSC}$ при температуре инкубации 38 °C, а Де Лей и Де Сметт [20] использовали 20%-ный формамид в буфере $2 \times \text{SSC}$ и при температуре инкубации 50 °C.

Для экспериментов по гибридизации с использованием 20%-ного формамида готовят буфер $5,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М NEPES (табл. 22.6), содержащий 55% формамида, а также буфер $3,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М NEPES (табл. 22.6), содержащий 35% формамида. Для опытов с использованием 50%-ного формамида готовят буфер $3,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М NEPES, содержащий 87,5% формамида.

22.7.2. Мембранный метод

Методика прямого связывания

Поскольку лишь небольшая часть ДНК комплементарна РНК, в зависимости от удельной активности препарата рРНК для эксперимента могут потребоваться ДНК-содержащие мембраны разного диаметра (например, до 10 мм).

1. Прямое связывание РНК с использованием небольших продолговатых мембран 3×9 мм проводят согласно методике для прямого связывания ДНК. В одну пробирку вносят 0,5 мкл меченой РНК. Мембраны отмывают так же, как в случае с ДНК. Для отделения неспаренных фрагментов рРНК от гибридов камеру для промывания помещают в раствор панкреатической РНКазы (25 мкг/мл в буфере $2 \times \text{SSC}$) и инкубируют 30 мин при 37 °C. После инкубации мембраны еще раз промывают. Измерив радиоактивность на мембране, определяют количество содержащейся на ней ДНК

Таблица 22.6. Состав реакционных смесей для определения конкуренции при изучении гомологии РНК мембранным методом

Добавляемый компонент	Количество конкурентной РНК при размере фильтра 3×9 мм		
	0	20 мкг	50 мкг
Меченая рРНК (25 мкг/мл)	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Конкурентная рРНК (1 мг/мл)	—	25 мкл	50 мкл
Буфер $0,1 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	50 мкл	25 мкл	—
Буфер $5,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	40 мкл	40 мкл	40 мкл
Буфер $3,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	—	—	—
Общий объем	110 мкл	110 мкл	110 мкл

Продолжение

Добавляемый компонент	Количество конкурентной РНК при диаметре фильтров 10 мм		
	0	50 мкг	100 мкг
Меченая рРНК (25 мкг/мл)	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Конкурентная рРНК (1 мг/мл)	—	50 мкл	100 мкл
Буфер $0,1 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	100 мкл	50 мкл	—
Буфер $5,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	—	—	—
Буфер $3,5 \times \text{SSC} + 10^{-3}$ М HEPES	200 мкл	200 мкл	200 мкл
Общий объем	350 мкл	350 мкл	350 мкл

(разд. 22.4.3). Если известна удельная активность РНК, то в импульсах в минуту или в микрограммах определяют связанную РНК, приходящуюся на 1 мкг ДНК.

2. Фильтры диаметром 10 мм делают с помощью дырокола для бумаги с одним отверстием, убедившись, что он хорошо очищен от смазочного масла. Инкубируют в 4-мл пробирках (Weaton Scientific, Millville, N. J.) в реакционной смеси объемом 0,35 мл. В каждую пробирку вносят 1—2 мкг меченой рРНК.

3. Термостабильность гибридов определяют так же, как и в случае с двухцепочечными комплексами ДНК (разд. 22.6.5).

Методика, основанная на конкуренции

Используют различные реакционные смеси в зависимости от размера мембран (табл. 22.6). Дополнительные сведения по этому вопросу содержатся в работе [36].

Пробирки с реакционной смесью инкубируют в тече-

ние ночи при 65 °С, после чего мембраны отмывают так же, как в методике прямого связывания. Можно обрабатывать мембраны РНКазой, хотя это почти не влияет на результат. Затем определяют количество ДНК на мембранах. Расчеты проводят так же, как в экспериментах по изучению гомологии ДНК с той разницей, что результат выражают в имп/мин·мкг ДНК, связанной с мембраной.

22.8. ЛИТЕРАТУРА

22.8.1. Общая литература

1. *Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R.* Analysis of repeating DNA sequences by reassociation, *Methods Enzymol.*, **24**, 363—406 (1974).

Несмотря на то что эта работа касается в основном ДНК эукариот с повторяющимися последовательностями, она содержит много практической информации, которую можно использовать при работе с ДНК бактерий (прокариот).

2. *Kennell D. E.* Principles and practices of nucleic acid hybridization, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **11**, 259—301 (1971).

Обзорная статья, посвященная гибридизации различных видов РНК с помощью мембранных методов.

3. *McCarthy B. J., Church R. B.* The specificity of molecular hybridization reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 131—150 (1970).

Статья помогает понять принципы реакций гибридизации ДНК и РНК (гомологии).

4. *Moore R. L.* Nucleic acid reassociation as a guide to genetic relatedness among bacteria, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **64**, 105—128 (1974).

Обзорная статья по использованию сходства нуклеиновых кислот в таксономии бактерий.

5. *Parish J. H.* Principles and practice of experiments with nucleic acids, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1972.

Книга содержит общую и специальную информацию, касающуюся широкого круга экспериментов.

6. *Wetmur J. G.* Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 337—361 (1976).

Обзор посвящен в основном кинетике реассоциации в свободном растворе.

22.8.2. Специальная литература

7. *Alwine J. C., Kemp P. J., Stark G. R.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5350—5354 (1977).
8. *Bishop D. H. L., Claybrook J. R., Spiegelman S. J.* *Mol. Biol.*, **26**, 373—387 (1967).

9. Bishop J. O. *Nature* (London), **224**, 600—603 (1969).
10. Bishop J. O. *Biochem. J.*, **116**, 223—228 (1970).
11. Brenner D. J., Fanning G. R., Rake A. V., Johnson E. K. *Anal. Biochem.*, **28**, 447—459 (1969).
12. Britten R. J., Kohne D. E. *Science*, **161**, 529—540 (1968).
13. Britten R. J., Pavich M., Smith J. *Carnegie Inst. Washington Yearb.*, **68**, 400—402 (1969).
14. Cashion P., Holder-Franklin M. A., McCully J., Franklin M. *Anal. Biochem.*, **81**, 461—466 (1977).
15. Chelm B. K., Hallick R. B. *Biochemistry*, **15**, 593—599 (1976).
16. Commerford S. L., *Biochemistry*, **10**, 1993—2000 (1971).
17. Crosa J. H., Brenner D. J., Falkow S. J. *Bacteriol.*, **115**, 904—911 (1973).
18. De Ley J. *J. Bacteriol.*, **101**, 738—754 (1970).
19. De Ley J., Cattoir H., Reynaerts A. *Eur. J. Biochem.*, **12**, 133—142 (1970).
20. De Ley J., De Smedt J. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **41**, 287—307 (1975).
21. Denhardt D. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 641—646 (1966).
22. Ehrenberg L., Fedorcsak I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **16**, 189—262 (1976).
23. Ferragut C., Leclerc H. *Ann. Microbiol. (Paris)*, **127A**, 223—235 (1976).
24. Franklin R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1504—1511 (1966).
25. Fredericq E., Oth A., Fontaine F. J. *Mol. Biol.*, **3**, 11—17 (1961).
26. Galau G. A., Britten R. J., Davidson E. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1020—1023 (1977).
27. Giles K. W., Meyers A. *Nature* (London), **206**, 93.
28. Gillespie D., Spiegelman S. J. *Mol. Biol.*, **12**, 829—842 (1965).
29. Gillespie S., Gillespie D. *Biochem. J.*, **125**, 481—487 (1971).
30. Grossman L., Moldave K. (ed.). *Methods Enzymol.*, **12B**, 87—160 (1968).
31. Hayes D. H., Gros F. *Methods Enzymol.*, **12B**, 771 (1968).
32. Hontebeyrie M., Gasser F. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 9—14 (1977).
33. Huang P. C., Rosenberg E. *Anal. Biochem.*, **16**, 107—113 (1966).
34. Hutton J. R. *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3537—3555 (1977).
35. Johnson J. L. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 245—256 (1978).
36. Johnson J. L., Francis B. S. J. *Gen. Microbiol.*, **88**, 229—244 (1975).
37. Kelly R. B., Cozzarelli N. R., Murray M. P., Deutscher P., Lehman I. R., Kornberg A. J. *Biol. Chem.*, **245**, 39—45 (1970).
38. Kirby K. S. *Methods Enzymol.*, **12B**, 87—99 (1968).
39. Ko C. Y., Johnson J. L., Barnett L. B., McNai H. M., Vercellotti J. R. *Anal. Biochem.*, **80**, 183—192 (1977).
40. Loening U. E. *Biochem. J.*, **102**, 251—257 (1967).
41. Mandel M., Igambi L., Bergendahl J., Dodson M. L., Jr., Scheltgen E. J. *Bacteriol.*, **101**, 333—338 (1970).
42. Mandel M., Schildkraut C. L., Marmur J. *Methods Enzymol.*, **12B**, 184—195 (1968).

22. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

43. *Markov G. G., Ivanov I. G. Anal. Biochem.*, **59**, 555—563 (1974).
44. *Marmur J. J. Mol. Biol.*, **3**, 208—218 (1961).
45. *Marmur J., Doty P. J. Mol. Biol.*, **5**, 109—118 (1962).
46. *McConkey E. H. Methods Enzymol.*, **12A**, 620—634 (1967).
47. *Meinke W. D., Golstein D. V., Hall M. R. Anal. Biochem.*, **58**, 82—88 (1974).
48. *Nonoyama M., Pagano J. S. Nature (London)*, **242**, 44—47 (1973).
49. *Orosz J. M., Wetmur J. G. Biochemistry*, **13**, 5467—5473 (1974).
50. *Rigby P. W. J., Dieckmann W., Rhodes C., Berg P. J. Mol. Biol.*, **113**, 237—251 (1977).
51. *Seidler R. J., Mandel M., J. Bacteriol.*, **106**, 608—614 (1971).
52. *Shaposhnikov J. D., Zerov Y. P., Ratovitski E. A., Ivanov S. D., Bobrov Y. V. Anal. Biochem.*, **75**, 234—240 (1976).
53. *Sogin M. L., Woese C. R., Pace B., Pace N. R. J. Mol. Evol.*, **2**, 167—174 (1973).
54. *Smith M. J., Britten R. J., Davidson E. H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4805—4809 (1975).
55. *Stark G. R., Willams J. G. Nucleic Acids Res.*, **6**, 195—203 (1979).
56. *Tereba A., McCarthy B. J. Biochemistry*, **12**, 4675—4679 (1973).
57. *Vogt V. M. Eur. J Biochem*, **33**, 192—200 (1973).
58. *Wang S. Y., Hashagen J. M. J. Mol. Biol.*, **8**, 333—340 (1964).
59. *Wetmur J. G., Davidson N. J. Mol. Biol.*, **31**, 349—370 (1968).
60. *Yamada K., Komagata K. J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 215—224 (1970).

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

ВВЕДЕНИЕ

Г. Филлипс

Полное уничтожение бактерий путем стерилизации, меры по предотвращению заражения и дезинфекция представляют собой важные стороны лабораторной работы. Методы общей бактериологии, опирающиеся на морфологию, рост, генетику, обмен веществ и систематику бактерий, основаны на использовании чистых культур, поддержание которых зависит от предшествующей стерилизации и последующего предотвращения заражения другими бактериями, содержащимися в средах, емкостях и на инструментах. Кроме того, бактериологические методы основаны на ликвидации оставшихся бактерий, которые могут инфицировать другие культуры и, что еще важнее, людей. Двойная цель техники лабораторной безопасности заключается в защите как эксперимента, так и экспериментатора, но безопасность человека стоит, конечно, на первом месте.

Из того факта, что обычно используемые бактерии присутствуют в окружающей среде, как будто следует, что они безвредны для человека. Действительно, между непатогенностью и патогенностью нет резкой границы; фактически бактерии имеют широкий спектр степени вирулентности по отношению к человеку. Вчерашний сапрофит сегодня может стать паразитом, а завтра возбудителем заболевания (в качестве примеров можно назвать *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и *Bacillus cereus*). Никогда нельзя забывать, что со всеми бактериями следует работать как с потенциальным источником опасности для здоровья человека.

В первой главе этого раздела описываются методы стерилизации материалов паром (влажным жаром),

сухим жаром, газами, облучением и фильтрацией. Вторая глава содержит методы физического предотвращения заражения и химической дезинфекции как в общих целях, так и для специальных лабораторных операций.

В настоящем руководстве при описании методов, в которых экспериментатор может подвергнуться опасным химическим или биологическим воздействиям, приведены соответствующие предупреждения. Правила радиоактивной безопасности представлены в разд. 16.4.1.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ

М. Коржинский

Цель процесса стерилизации состоит в удалении или уничтожении всех живых микроорганизмов внутри или на поверхности предмета. В микробиологических лабораториях для стерилизации культуральных сред, оборудования и стеклянной посуды используется пар, для стерилизации стеклянной посуды и металлического оборудования — сухой жар, для стерилизации инструментов — газ, для стерилизации растворов — фильтрация и в особых случаях применяют радиоактивное облучение. Стерилизация широко используется в больницах, фармакологии и на производстве. Изменения в службах охраны здоровья, в типах медицинской продукции, требующих стерилизации, а также государственные постановления влекут за собой изменения в технике осуществления стерилизации. Стерилизация характеризуется развивающейся технологией с непрерывным усовершенствованием в конструкциях оборудования и его управлении. Методы стерилизации описываются во многих работах общего характера [1—13].

Стерилизация есть вероятностная функция. Гибель клеток бактерий обычно описывается экспоненциальной кривой подобно химической реакции первого порядка (рис. 23.1). Эффективность стерилизации выражается в виде статистической вероятности выживания клеток [35]. По окончании процессов стерилизации (влажным жаром, сухим жаром, ионизирующим облучением и окисью этилена) вероятность выживания клетки должна составлять не более 10^{-6} .

Любой метод стерилизации, за исключением фильтрации, можно охарактеризовать скоростью уничтожения живых микроорганизмов. Параметр D применяется для оценки стерилизации путем нагревания и представляет собой время, необходимое при данной температуре для получения десятикратного (90%-ного) уменьшения по-

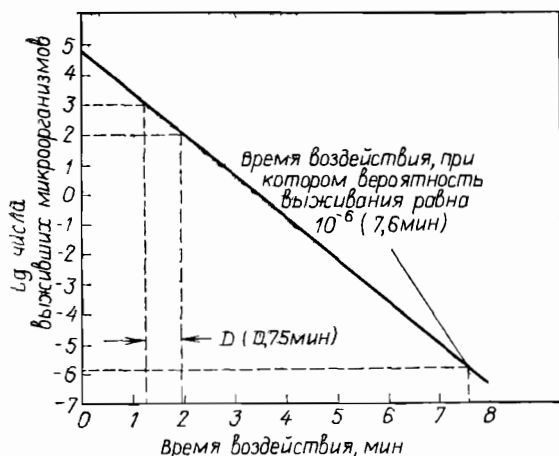


Рис. 23.1. Графическое определение величины D и вероятности выживания микроорганизмов.

пуляции микробов; температуру часто обозначают в нижнем индексе (например, D_{100}). Параметр D можно получить графически построением зависимости логарифма числа выживших бактерий от времени воздействия стерилизующего агента. При этом параметр D определяется как время на абсциссе, соответствующее десятикратному уменьшению числа бактерий по ординате (рис. 23.1). Этот параметр можно также вычислить [15]. Параметр z представляет собой изменение температуры в градусах по шкале Цельсия или Фаренгейта, которое требуется для изменения параметра D в 10 раз. Параметр F_0 представляет собой значение инактивации бактерий под действием нагревания, вычисляемое делением необходимого времени при заданной температуре нагревания на эквивалентное время при 121°C (250°F), когда z равно 10°C (18°F).

Часто для определения числа выживших бактерий используют два метода, а именно: подсчет числа клеток, выживших после посева в чашки (по числу образовавшихся колоний), и оценка наиболее вероятного числа (НВЧ) выживших клеток с использованием флуктуационного теста. Первый метод описан в разд. 11.2 этой

книги. При его использовании строят график зависимости логарифма числа подсчитанных в чашках клеток от времени при данной температуре. По этим точкам проводят прямую (разд. 11.5.7) либо на глаз, либо с помощью метода наименьших квадратов (разд. 11.5.8) и определяют по ней параметр D . Процесс гибели клеток, как правило, подчиняется логарифмическому закону. Однако наблюдаются и отклонения от этого закона. В этих случаях вычисление параметра D не очень существенно. Отклонения могут объясняться такими факторами, как гетерогенность начальной популяции в отношении устойчивости, различное состояние клеток в условиях эксперимента (клетки, сбившиеся в комки), а также адаптация клеток в процессе нагревания [24].

Для определения числа бактерий, выживших при различных временах воздействия, и тем самым для получения параметра D [10, 13] можно также использовать флуктуационный тест. Эксперимент должен быть поставлен таким образом, чтобы во всех пробирках наблюдался рост при самом коротком времени экспозиции и рост отсутствовал бы во всех пробирках в случае наиболее продолжительной экспозиции. Промежуточные времена экспозиции следует выбирать так, чтобы рост имел место в определенной части пробирок. Рекомендуется использовать как минимум три разные температуры. Уравнение для вычисления числа выживших бактерий в пробе имеет вид

$$B = \ln r/q = 2,303 \lg (r/q),$$

где B — вероятное число выживших бактерий, r — число проб, исследуемых за временной интервал, и q — число стерильных проб [23].

Для стерилизации в промышленных условиях применяют общепринятые способы, но необходимо провести контрольные исследования, используя микроорганизмы с заранее известной устойчивостью; в большинстве случаев это бактериальные споры. Необходимо также периодически проверять суспензию спор на сохранение устойчивости. При установлении режима стерилизации следует использовать по крайней мере три параллельные пробы для каждого времени воздействия и для каждого изучаемого параметра. Точность результата

Таблица 23.1. Бактерии, споры которых часто используют как биологические индикаторы

Споры	Способ стерилизации	Приближенное значение величины D
<i>Bacillus subtilis</i>	Окись этилена (600 мг/л при 54 °C и 50%-ой относительной влажности)	3,0 мин
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Влажный жар (≥ 121 °C)	1,5 мин
<i>Clostridium sporogenes</i>	Влажный жар (≤ 121 °C)	0,2—0,8 мин
<i>Bacillus subtilis</i>	Сухой жар (170 °C)	0,8 мин
<i>Bacillus pumilus</i>	Ионизирующее облучение	0,17 Мрад

Таблица 23.2. Поставщики биологических индикаторов

Тип индикатора	Поставщик (разд. 23.6)
Полоска с нанесенными на нее спорами одного вида бактерий	American Biological Control Co. American Sterilizer Co. BBL Microbiology Systems Castle Co. Div., Sybron Corp. Gibraltar Biological Laboratories, Inc. North American Science Associates, Inc.
Полоска со спорами бактерий двух видов	American Sterilizer Co. Castle Co. Div., Sybron Corp. North American Science Associates, Inc. Proper Manufacturing Co., Inc.
Полоска со спорами известной численности	American Sterilizer Co.
Полоска со спорами и определенным количеством культуральной среды	3M Co.
Суспензия спор в культуральной среде	BBL Microbiology Systems EM Laboratories, Inc.
Суспензии спор	American Sterilizer Co. Castle Co. Div., Sybron Corp. North American Science Associates, Inc.

есть функция числа параллельных проб. Чтобы была уверенность в надежности результатов стерилизации, перед экспериментом следует тщательно проверить оборудование. По вопросам стерилизации см. обзор [25].

Перед стерилизацией необходимо определить также число и типы микроорганизмов, находящихся в объекте (микробное загрязнение). Время, требуемое для стерилизации, получают умножением параметра D для имеющегося в материале микробного загрязнения на общее число бактерий в стерилизуемом объеме. Если определено время, необходимое для инактивации загрязняющих микроорганизмов, можно вычислить вероятность отсутствия стерильности в отношении наиболее устойчивого микроба.

Биологические индикаторы (БИ) содержат известные концентрации микроорганизмов, обычно бактериальных спор, которые при определенном воздействии гибнут с прогнозируемой скоростью. БИ могут быть приготовлены на различных носителях (например, на фильтровальной бумаге, нитях или кусочках глины), иногда их непосредственно вносят на поверхность или внутрь стерилизуемого материала. В табл. 23.1 указаны виды бактерий, споры которых чаще всего используются для наблюдения за процессами стерилизации. В табл. 23.2 приведены поставщики БИ.

Вероятность отсутствия стерильности для микроорганизма из числа БИ может быть вычислена так же, как и для микробного загрязнения. Для определения фактора безопасности должно быть известно, как соотносятся между собой вероятности нестерильности БИ и исследуемого загрязнения. Часто вместо параметра D для микробиологического загрязнения в уравнение вероятности подставляют параметр D для БИ. Это позволяет в самых плохих условиях найти время, необходимое для стерилизации.

Системный подход к производству стерильных продуктов включает в себя следующие условия:

1. Приготовление, отбор и распределение материала таким образом, чтобы число микробов в нем было сведено к минимуму.

2. Использование того процесса стерилизации, который соответствует образцу и его упаковке.

Таблица 23.3. Стерилизация тех или иных объектов разными способами

Способ	Объект
Влажный жар	Растворы для парентерального введения, инструменты, оборудование для асептической работы, культуральные среды, резиновые пробки
Сухой жар	Стеклопосуда, масла, инструменты, иглы, петролатум, порошки, оборудование для асептической работы
Оксид этилена	Оборудование для дачи наркоза, катетеры, диагностическое оборудование, вживляемые протезы, лабораторное оборудование, оборудование для лечения дыхательных органов, хирургическое оборудование, вспомогательные хирургические материалы, оптические инструменты, пластмассовые трубки, упаковочные материалы, ветошь
Ионизирующее облучение	Порошки, перевязочный материал, пробирки для крови, ланцеты для взятия крови, щетки, мази от ожогов, ожоговые тампоны, центрифужные стаканы, диализные ячейки, хирургические нити, подстилки для лабораторных животных, хирургическая одежда
Фильтрация	Газы, жидкости, мази и масла с низкой вязкостью

3. Выбор такой упаковки, которая не препятствовала бы процессу стерилизации и способствовала бы поддержанию стерильности после его окончания.

4. Измерение параметров процесса стерилизации для контроля правильности его проведения.

5. Хранение образцов после стерилизации в соответствующих условиях.

6. Доставка, открывание контейнеров и использование материала без загрязнений.

В табл. 23.3 представлены известные методы стерилизации и материалы, обычно стерилизуемые этими методами. Ниже перечислены факторы, вызывающие гибель микроорганизмов, которые следует учитывать при выборе процесса стерилизации.

1. Конструкция и (или) химический состав образца.
2. Биологическое и физическое состояние микроорганизма перед стерилизацией.
3. Наследственная устойчивость микроорганизма к стерилизации и получаемая в итоге скорость его гибели.
4. Исходное количество микроорганизмов в образце, подлежащем стерилизации.
5. Сила стерилизующего агента.
6. Продолжительность пребывания в условиях стерилизации.

23.1. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПАРОМ

Стерилизацию паром (влажным жаром) проводят в автоклаве с насыщенным паром под давлением обычно в течение 15 мин при температуре 121°C. Могут быть использованы и другие соотношения между временем и температурой. Вопрос об эквивалентной летальности подробно рассмотрен в работах [2,9—11, 14, 34, 36].

Большинство автоклавов относится к гравитационным: пар движется в них сверху вниз под действием разности плотностей воздуха и пара (рис. 23.2). В таких автоклавах существенны проблемы проникновения влаги, перегрева, удаления воздуха, а также отрицательные последствия, вызываемые воздействием тепла и (или) влаги. Весьма важны правильное приготовление стерилизуемых образцов и надлежащая загрузка. Изготовители автоклава дают указания по установке термопар в стерилизуемом материале, для того чтобы определить оптимальный режим загрузки автоклава.

Наиболее удобны для использования в лабораториях автоматические автоклавы, оснащенные датчиками времени и автоматическими регуляторами температуры. Применяются и некоторые другие системы автоклавирования влажным жаром, в которых для удаления пузырьков воздуха используют высокий вакуум, попеременную подачу пара и вакуума, каскад горячей воды или ванночки для погружения в нее (Vacudyne-Altair, American Sterilizer Co., FMC, и Rexham Co.).

Присутствие воздуха приводит к тому, что камера нагревается медленнее и до более низкой температуры. В табл. 23.4 представлены значения температур для не-

Таблица 23.4. Влияние неполного выхода воздуха на температуру в автоклаве [8]

Давление, Па	Температура, °С			
	насыщенный пар, весь воздух удален	удалены $\frac{2}{3}$ воздуха	удалена $\frac{1}{3}$ воздуха	воздух не удален совсем
$3,5 \cdot 10^4$	109	100	90	72
$7 \cdot 10^4$	115	109	100	90
$10,5 \cdot 10^4$	121	115	109	100
$14 \cdot 10^4$	126	121	115	109
$17,5 \cdot 10^4$	130	126	121	115
$21 \cdot 10^4$	135	130	126	121

скольких смесей воздуха с паром в сравнении с температурами для чистого пара. Лабораторные автоклавы должны иметь датчики режима работы на шкалах термометра (установка температуры зависит от давления насыщенного пара) и манометра.

Важно знать, какое влияние на проникновение пара оказывают загружаемые образцы, вязкость растворов, размеры емкостей, а также плотность загрузки. Кроме того, на гибель микробов может влиять химический состав раствора, используемого для получения пара [18]. В каждой отдельной загрузке материалов следует выяв-

Таблица 23.5. Влияние объема жидкости и числа емкостей на время, необходимое для достижения температуры 121 °С в автоклаве [38]

Объем содержащейся в емкости жидкости, л	Число емкостей в одной загрузке	Начальная температура жидкости, °С	Время, необходимое для достижения жидкостью температуры 121 °С, мин	Общее время, цикла, мин
0,5	30	29	19	29
1,0	20	26	34	44
2,0	10	27	37	47
3,0	8	26	43	53
4,0	5	26	52	62
5,0	5	26	60	70
6,0	4	26	62	72

лять и учитывать области, в которых возможно понижение температуры. Упаковки должны располагаться свободно по отношению друг к другу, чтобы не препятствовать проникновению пара. Предметы должны быть распределены так, чтобы обеспечить перемещение вниз более тяжелого воздуха.

В табл. 23.5 показано, как в зависимости от объема жидкости и числа емкостей в загрузке меняется время, требуемое для стерилизации. Это время меньше для малых объемов. Таким образом, можно подобрать времена циклов стерилизации по размерам и числу емкостей.

Когда стерилизуемые растворы находятся в стеклянных сосудах, требуется соблюдать предосторожности. Чтобы по окончании цикла стерилизации эти емкости не разбились, необходимо контролировать время охлаждения, а также медленно понижать давление. В некоторых стерилизаторах для предотвращения повреждения стекла используют системы регулируемого охлаждения водой. Перед открыванием автоклава необходимо убедиться, что в нем установилось давление окружающей среды. Для большинства современных автоклавов такой проблемы нет, так как необходимый контроль осуществляется в них автоматически. При стерилизации колб и бутылей нужно неплотно закрывать пробки, чтобы обеспечить вентиляцию и предотвратить разбивание стекла. В промышленных масштабах в таких случаях часто используют системы повышенного воздушного давления. Когда емкости вынимают из автоклава, в них может понизиться давление, что вызывает заброс воздуха внутрь и приводит к загрязнению раствора, если только не используют плотные крышки или не принимают других предупредительных мер.

23.2. СТЕРИЛИЗАЦИЯ СУХИМ ЖАРОМ

Материалы, которые нельзя стерилизовать паром, часто стерилизуют сухим жаром (например, жиры, смазки, минеральное масло, воски и порошки). Для стерилизации сухим жаром используют горячий нагретаемый в камеру воздух и инфракрасное излучение. Существует много выпускаемых промышленностью газовых

и электрических стерилизаторов сухим жаром, включая печи периодического действия и трубы накаливания непрерывного действия.

Сухой жар менее эффективен, чем пар, поэтому при его использовании требуются более длительные экспозиции при более высоких температурах. В табл. 23.6

представлены примеры соотношений между временем и температурой в случае стерилизации сухим жаром. Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительные периоды стерилизации. При использовании сухого жара более высокие температуры могут неблагоприятно действовать на некоторые материалы. Кроме того, если нет циркуляции воздуха [7], может происходить образование слоев воздуха с разными температурами.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки. Известны примеры типичных значений параметра D для спор при обработке сухим жаром [10].

Таблица 23.6. Режимы, используемые при стерилизации сухим жаром [8, 22, 38]

Температура	Время, ч
170 °C (340 °F)	1,0
160 °C (320 °F)	2,0
150 °C (300 °F)	2,5
140 °C (285 °F)	3,0

23.3. ГАЗЫ

Газы для стерилизации применяются в тех случаях, когда медицинские материалы и оборудование нельзя стерилизовать другими способами. Процесс стерилизации газом более сложно контролировать, чем другие способы стерилизации, поскольку он характеризуется множеством параметров. При выборе конкретного способа стерилизации газом необходимо учитывать такие

факторы, как существование различных газовых слоев, температурных зон, присутствие влаги, химических барьеров, механических препятствий диффузии (например, упаковка материалов), конденсация и полимеризация [4, 16, 17].

23.3.1. Окись этилена

Хотя показано, что бактерицидными свойствами обладают многие газы (формальдегид, окись пропилена, β -пропиолактон, озон, надуксусная кислота и метилбромид), для стерилизации медицинских приборов наиболее широко используется окись этилена (ОЭ) благодаря ее хорошей совместимости с различными материалами (табл. 22.3). ОЭ обладает следующими свойствами:

Молекула имеет строение циклического эфира

Запах эфира

Бесцветный газ при обычной температуре

Температура кипения $10,8^{\circ}\text{C}$

Высоко реакционноспособный алкилирующий агент

Легко полимеризуется

Легко воспламеняется

Пределы взрывоопасной концентрации в воздухе от 3 до 100%

Молекулярная масса 44,05

Плотность $0,87 \text{ г/см}^3$ при 20°C

Давление насыщенного пара $1,48 \cdot 10^5 \text{ Па}$ при 20°C .

Для снижения воспламеняемости часто используют смесь ОЭ с дихлордифторметаном. В табл. 23.7 приведено несколько типовых выпускаемых промышленностью газовых смесей с ОЭ. В фармацевтической промышленности используется 100%-ная ОЭ, но в лабораторных целях она употребляется редко.

ОЭ применяют как стерилизующий агент в специальных емкостях или сосудах. Основные элементы стерилизатора, предназначенного для работы с ОЭ, представлены на рис. 23.3. Фирма — изготовитель оборудования для стерилизации обычно снабжает его инструкциями, которые необходимо точно выполнять. При стерилизации 100%-ной ОЭ используются давления ниже атмосферного, а при стерилизации ОЭ в сочетании с инертным газом — повышенные давления. *Предупреждение:* ОЭ взрывоопасна, а ее радикалы мутагенны.

Таблица 23.7. Выпускаемые промышленностью стерилизующие смеси на основе окиси этилена

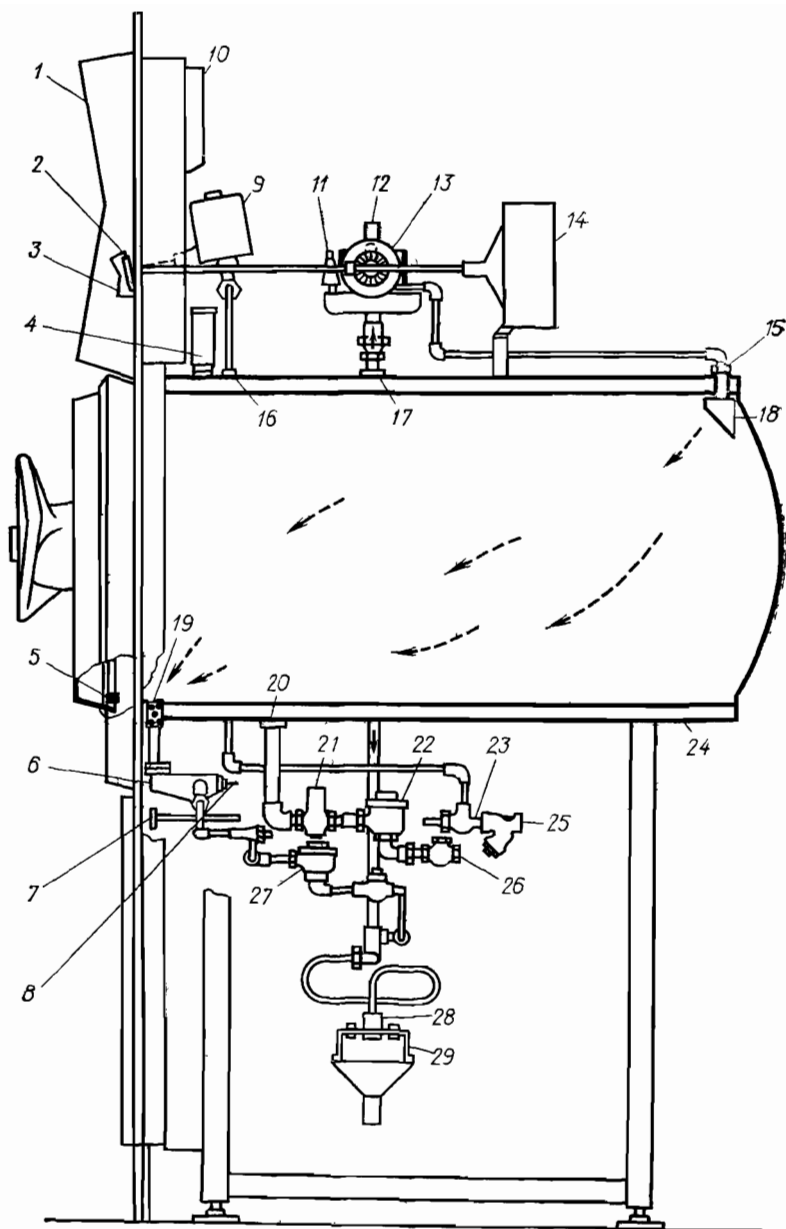
Торговое наименование	Состав
Оксифьюм стерилант-12 ^{а)}	12% окиси этилена, 88% дихлордифторметана
Оксифьюм стерилант-20 ^{а)}	20% окиси этилена, 80% углекислого газа
Оксифьюм стерилант-30 ^{а)}	70% окиси этилена, 30% углекислого газа
Пенноксид ^{б)}	12% окиси этилена, 88% дихлордифторметана
Стероксид-12 ^{а)}	То же
Криоксид ^{а)}	11% окиси этилена, 79% трихлормонофторметана, 10% дихлордифторметана
Бенвицид ^{а)}	11% окиси этилена, 54% трихлормонофторметана, 35% дихлордифторметана
Карбоксид ^{а)}	10% окиси этилена, 90% углекислого газа

а) Linde Div., Union Carbide Corp. б) Pennsylvania Engineering Co
 в) Castle Div., Sybron Corp. д) American Sterilizer Co. е) Matheson Gas Products, Div. of Will Ross.

Таблица 23.8. Пределы изменений параметров, обычно используемые при стерилизации окисью этилена (ОЭ)

Параметр	Область изменений
Предварительная увлажненность	40—50% относительной влажности
Концентрация ОЭ	250—1 200 мг/л
Температура	В камере до 125 °F (52 °C)
Время	2—16 ч
Относительная влажность	40—50%

Использование ОЭ в качестве стерилизующего агента требует понимания факторов, влияющих на ее активность. Роли ограничивающих факторов могут играть диффузия ОЭ, влажность и проникновение тепла в материалы. Диффузионные барьеры упаковочных материалов помогает преодолеть предварительное увлажне-



ние, которое способствует лучшему проникновению газа. Увлажнение перед стерилизацией обеспечивает также гидратированное состояние спор.

ОЭ эффективно убивает все бактериальные вегетативные клетки и споры [28, 29]. При концентрациях от 220 до 880 мг ОЭ на 1 л и температуре от 5 до 37°C скорость гибели бактерий подчиняется логарифмическому закону. При удвоении концентрации ОЭ время, требуемое для стерилизации, уменьшается примерно в два раза, а температурный коэффициент реакции с ОЭ составляет 2,7 на каждые 10°C [37].

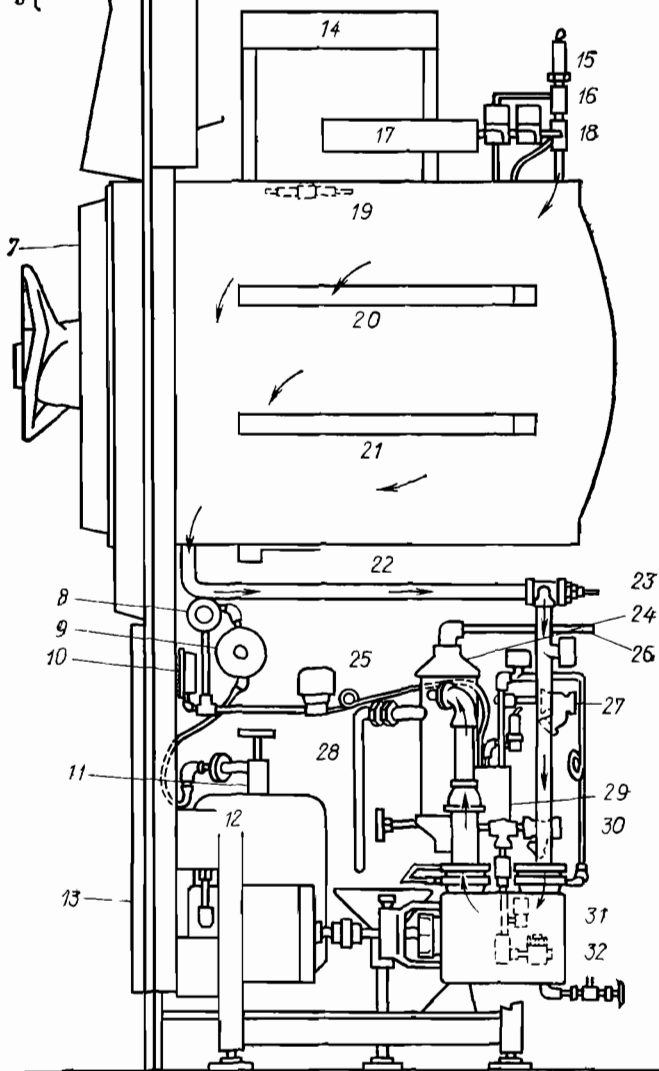
Обычно для стерилизации используют ОЭ в концентрациях от 250 до 1200 мг на каждый литр объема камеры. При этом относительная влажность атмосферы должна находиться в пределах от 35 до 60%, однако ее значение не столь существенно, как концентрация ОЭ [27]. Точная продолжительность процесса стерилизации зависит от температуры, концентрации ОЭ, типа материалов, подлежащих стерилизации, и степени микробного загрязнения. Обычно для стерилизации медицинских принадлежностей в стерилизаторе объемом 0,56 м³ достаточна обработка ОЭ в концентрации 700 мг/л в течение 5—8 ч при 100°F (37,7°C) или в течение 3—4 ч при 130°F (54,4°C). В табл. 23.8 приведены пределы изменения параметров процесса стерилизации с применением ОЭ.

Рис. 23.2. Схема устройства автоклава с подачей пара сверху вниз. Воспроизводится с любезного согласия компании American Sterilizer Co. (г. Эри, шт. Пенсильвания) и издательства Charles C Thomas Publisher (г. Спрингфилд, шт. Иллинойс) из работы Перкинса [8]. 1 — панель с датчиками; 2 — клапан, регулирующий подачу пара; 3 — ручка управления; 4 — вакуумный сушиватель; 5 — дверное уплотнение; 6 — выход для пара; 7 — клапан подачи пара; 8 — датчик температуры; 9 — регулятор давления; 10 — аппаратура автоматического контроля за циклом; 11 — аварийный клапан; 12 — выпуск в атмосферу; 13 — многоходовой клапан; 14 — коробка многоходового переключения; 15 — поступление пара из рубашки в камеру, здесь же — выпуск пара из камеры; 16 — поступление пара в рубашку; 17 — поступление пара из рубашки в камеру; 18 — дефлектор; 19 — фильтр; 20 — выход конденсата из рубашки; 21 — фильтр; 22 — запорная ловушка; 23 — клапан; 24 — рубашка для пара; 25 — подвод пара; 26 — клапан для контрольных измерений; 27 — ловушка для пара; 28 — выход отработанного конденсата; 29 — зажим с постоянным воздушным зазором.

1
2
3
4
5
6

Два режима работы:

- 1) 110 - 120В, ток однофазный, 60Гц, 5А;
- 2) 208 - 240В, ток трехфазный 60Гц, 30А



23.3.2. Формальдегид

Хотя газообразный формальдегид используется очень широко для стерилизации, он представляет собой хороший стерилизующий агент объемов и поверхностей. Одной из первых областей применения формальдегида было его использование при обработке больничных палат. Он эффективен против бактерий, грибов и вирусов, а также против насекомых и других животных [38].

Газообразный формальдегид для стерилизации может быть получен нагреванием параформальдегида, который представляет собой смесь полиоксиметиленгликолей, содержащих от 90 до 99% формальдегида. Химический состав параформальдегида выражается формулой $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$, где n обозначает 8—100 молекул формальдегида. При нагревании параформальдегид деполимеризуется с выделением газообразного формальдегида. Стерилизация газообразным формальдегидом, полученным из параформальдегида, более эффективна, чем стерилизация формальдегидом, испаряющимся из раствора.

Формальдегид, полученный из параформальдегида, может быть использован для стерилизации образцов из нержавеющей стали, резины, пластмассы и стекла, за-

Рис 23.3. Схематическое изображение основных узлов стерилизатора, работающего на окиси этилена. Воспроизводится из работы Перкинса [8] с любезного разрешения компании American Sterilizer Co. (г. Эри, шт. Пенсильвания) и издательства Charles C Thomas, Publisher (г. Спрингфилд, шт. Иллинойс). 1 — панель управления; 2 — датчики; 3 — установка времени; 4 — установка температуры; 5 — установка отрицательного давления; 6 — установка положительного давления; 7 — дверца с безопасным запором; 8 — клапан, регулирующий поступление газа; 9 — газовый фильтр; 10 — манометр; 11 — баллон с газом; 12 — клапан, регулирующий поступление пара; 13 — дверца отсека обслуживания; 14 — коробка электропитания; 15 — аварийный клапан; 16 — поступление пара в камеру; 17 — воздушный фильтр; 18 — поступление газа в камеру; 19 — термометры; 20, 21 — вспомогательные нагреватели; 22 — регулируемый нагреватель; 23 — место проверки температуры; 24 — уравнительный резервуар; 25 — газовый клапан-змейвик; 26 — выпуск газа; 27 — подвод холодной воды; 28 — выход отработанного конденсата; 29 — газовый кондиционер (теплообменник); 30 — подвод пара; 31 — вакуумный насос; 32 — выход пара.

вернутых либо в ткань, либо в бумагу [39]. Формальдегид вступает в реакцию с первичными амино- и амидогруппами, вторичными амидными индольными и имидазольными группами, радикалами меркаптанов и фенольными кольцами [40]. Вирусы могут инактивироваться в результате взаимодействия альдегидной группы формальдегида с нуклеиновыми кислотами [20]. С целью уменьшения воздействия газа на персонал следует использовать нейтрализацию формальдегида аммиаком, приводящую к образованию гексаметилентетрамина.

23.4. ИЗЛУЧЕНИЕ

Излучение может быть как неионизирующим, так и ионизирующим. Неионизирующее излучение включает такие виды, как инфракрасное, ультрафиолетовое, ультразвуковое и радиочастотное. Ионизирующее излучение может быть корпускулярным (β -частицы, или электроны) или электромагнитным (рентгеновские лучи и γ -лучи). γ -Лучи, испускаемые такими изотопами, как ^{60}Co или ^{137}Cs , являются примером электромагнитного излучения. Электромагнитное излучение приводит к ионизации атомов, т. е. к выбиванию электрона с орбиты за счет переданной падающим γ -квантом энергии. Выбитые электроны затем ведут себя аналогично β -частицам в реакциях ионизации. Поэтому и корпускулярное, и электромагнитное излучения считаются ионизирующими излучениями. Ионизирующая радиация представляет собой воспроизводимый и надежный способ стерилизации.

Единицей дозы облучения является рад, который эквивалентен поглощенной энергии примерно в 100 эрг/г. Дозы стерилизации обычно выражают в мегарадах (10^6 рад).

Эффективность облучения зависит от полученной дозы, а выбор дозы определяется микробным загрязнением, а также формой и составом материала, подлежащего стерилизации. Для количественного определения величины поглощенной дозы облучения используют растворы сульфата железа, сульфата железа (II)-меди или сульфата церия, а также пленки окрашенной пластмассы.

Важно определить устойчивость к облучению микробного загрязнения образца, подлежащего стерилизации, и оценить эту устойчивость по отношению к устойчивости индикаторного микроорганизма (такого, как споры *Bacillus pumilus*). Установив один раз эффективность стерилизации по отношению к определенному стерилизуемому объекту, можно вычислять дозы облучения, необходимые для каждого конкретного случая.

23.4.1. Электроны

Промышленностью выпускаются мощные электронные ускорители, которые фокусируют выходящие электроны в узкий пучок. Такой пучок может быть использован для стерилизации. В большинстве ускорителей для генерации электронов используют катодную трубку. Электроны в ней ускоряются электростатическим или высокочастотным полем, благодаря чему увеличивается их проникающая способность. При использовании электронных ускорителей необходим тщательный контроль энергии электронов, их потоков, ширины пучка и времени воздействия.

Недостатком этой системы является относительно низкая проникаемость электронов по сравнению с γ -лучами. Поскольку электрон имеет заряд и массу, его средние длины пробега меньше, чем толщины поглощения электромагнитного излучения равной энергии. γ -Лучи с энергией 10^6 электронвольт (МэВ) имеют длину пробега в воде примерно в 80 раз больше, чем электроны с такой же энергией.

Электронные ускорители употребляются для промышленной стерилизации образцов с низкой плотностью, таких, как хирургический шовный и перевязочный материалы. Подобный способ стерилизации имеет ряд преимуществ: он позволяет быстро облучать материалы на конвейере, еще на стадии их производства. Такое прекрасное сочетание с производством и связанный с этим конечный экономический эффект, по-видимому, приведут к тому, что этот способ будет широко применяться в будущем.

23.4.2. γ -Лучи

На гибель микроорганизмов при γ -облучении влияет множество параметров. С ростом парциального давления кислорода, например, эффекты облучения усиливаются благодаря тому, что легче образуются перекиси и (или) озон. В то же время сульфгидрильные и восстанавливающие соединения действуют как защитные агенты, поскольку в их присутствии эффект кислорода уменьшается. С удалением воды устойчивость к облучению возрастает, так как при этом снижается образование перекиси.

Наиболее чувствительны к γ -облучению вегетативные клетки бактерий, затем идут плесневые грибы, дрожжи, бактериальные споры и вирусы. В большинстве случаев для надежного уничтожения микроорганизмов достаточно дозы облучения 2,5 Мрад. γ -Облучение успешно применяется для стерилизации таких предметов, как больничные принадлежности, антибиотики, витамины, гормоны, стероиды, пластмассовое разовое медицинское оборудование, чашки Петри и хирургический шовный и перевязочный материалы.

В связи со специальными требованиями по технике безопасности, а также высокой стоимостью источников γ -облучения и систем электронного облучения большинство исследований с использованием облучения проводят на крупных производственных объектах или в таких солидных учреждениях, как университеты. В качестве лабораторных облучателей доступны малые источники γ -облучения (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, Ltd.). Теоретические основы стерилизации облучением, оборудование для него, а также организационная структура соответствующих лабораторий рассматриваются в ряде работ [1, 5, 12].

23.4.3. Ультрафиолетовые лучи

Ультрафиолетовое облучение (УФ-облучение) в диапазоне 254 нм используют в целях стерилизации, но его применение ограничено из-за малой проникающей способности. От УФ-облучения микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью или дру-

гими защитными оболочками. Они гибнут при получении соответствующей дозы энергии излучения. Общая доза, полученная микроорганизмом, есть функция УФ-облучения, расстояния от источника и продолжительности воздействия. Вегетативные формы более чувствительны к УФ-облучению, чем споры, которые в 3—10 раз более устойчивы.

23.4.4. Радиочастотное облучение

Пищевая промышленность была первой в исследованиях радиочастотного облучения, однако для стерилизации оно долгое время не использовалось. Не исключено, что в будущем этот вид облучения будет применяться более широко, возможно, в сочетании с дезинфицирующими средствами. Нельзя только упускать из виду, что оно имеет ограничения: его летальное действие видоспецифично, поэтому для уничтожения разных микроорганизмов могут потребоваться различные частоты. Необходимо научиться управлять радиочастотным облучением и обеспечить надежную безопасность персонала. Следует отметить также, что это облучение может создавать помехи местным системам связи.

23.5. ФИЛЬТРАЦИЯ

Фильтрация — один из старейших методов, используемых для стерилизации растворов и газов. Как окончательный процесс он менее предпочтителен, чем стерилизация паром, из-за большей вероятности прохождения микроорганизмов через фильтр.

Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их матрикса. Для пропускания раствора через фильтр требуется вакуум или давление. Существуют два основных типа фильтров — глубинные и мембранные. Глубинные фильтры состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в матриксе фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру.

Таблица 23.9. Преимущества и недостатки мембранных и глубинных фильтров [19]

Тип	Преимущества	Недостатки
Глубинные фильтры	Большая емкость Задерживается большой процент частиц с размером, меньшим номинального размера пор	Материал фильтра может проникать в фильтрат Возможен бактериальный рост, особенно в случае большой загрузки фильтра Задерживается часть раствора Отсутствие четких параметров размера пор
Мембранные фильтры	Эффективность не зависит от скорости потока и перепада давлений Накопление больших частиц у поверхности фильтра может улучшить фильтрацию Материал фильтра не размывается Фильтрат почти или совсем не задерживается	Низкая емкость Могут задерживать частицы с размером, меньшим номинального размера пор Непрочные по сравнению с глубинными фильтрами

и захват ими частиц определяется в основном размером последних. Некоторые преимущества и недостатки мембранных и глубинных фильтров перечислены в табл. 23.9. В продаже имеются прекрасные фильтры (Millipore Corp., Gelman Instrument Co., и Pall Corp.), а в проспектах описываются составы и матрицы фильтров для специальных целей [21, 25, 26, 30—33].

Фильтрация применяется, в частности, для масляных эмульсий и растворов, неустойчивых к нагреванию. Мембранная фильтрация широко применяется для стерилизации масел, мазей, офтальмологических растворов, растворов для внутривенных инъекций, диагностических препаратов, радиоактивных лекарственных препаратов, сред для культур тканей, а также растворов витаминов и антибиотиков.

Целостность мембранных фильтров можно определить путем исследования «пузырьковой точки» [30] или задержки частиц, а также с помощью способа прямого потока [32].

23.6. ФИРМЫ-ИЗГОТОВИТЕЛИ

American Biological Control Co., Tenaflly, NJ 07670
 American Sterilizer Co., 2222 W. Grandview Blvd., Erie, PA 16506
 Atomic Energy of Canada, Ltd., 275 Slater St., Ottawa 4, Ontario, Canada
 BBL Microbiology Systems, P. O. Box 243, Cockeysville, MD 21030
 Castle Co. Div., Sybron Corp., 1777 E. Henrietta Rd., Rochester, NY 14623
 EM Labs, Inc., 500 Executive Blvd., Elmsford, NY 10523
 FMC, 200 E. Randolph Dr., Chicago, IL 60601
 Gelman Instrument Co., 600 S. Wagner St., Ann Arbor, MI 48103
 Gibraltar Biological Laboratories, Inc., Fairfield, NJ 07006
 Linde Division, Union Carbide Corp., 51 Cragwood Rd., South Plainfield, NJ 07080
 Matheson Gas Products (Div. of Will Ross, Inc.), 932 Paterson Plank Rd., East Rutherford, NJ 07073
 Millipore Corp., P. O. Box F, Bedford, MA 01730
 North American Science Associates, Inc., 2261 Tracy Rd., Northwood, OH 43619
 Pall Corp., 30 Sea Cliff Ave., Glen Cove, NY 11542
 Pennsylvania Engineering Co., 32nd St. and A.V.R.R., Pittsburgh, PA 15201
 Propper Manufacturing Co., 36—04 Skillman Ave., Long Island City, NY 11101
 Rexham Corp., 5501 N. Washington Blvd., Sarasota, FL 33580
 3M Co., 3M Center, St. Paul, MN 55101
 Vacudyne-Altair, 375 E. Joe Orr Rd., Chicago Heights, IL 60411

23.7. ЛИТЕРАТУРА

23.7.1. Общая литература

1. *Alexander P., Bacq Z. M. (ed.). Fundamentals of radiology, vol. 5.* Pergamon Press, The MacMillan Co., New York (1961).
 Хороший обзор по воздействию радиации на биологические системы.
2. AVI Publishing Co. Laboratory manual for food canners and processors. AVI Publishing Co., Westport, Conn. (1968).
 Эта книга написана преимущественно для работников консервной промышленности, в ней даны основополагающие микробиологические и инженерные методы и понятия, относящиеся к стерилизации паром. Книга служит руководством для тех, кто начинает работать в области технологии, использующей стерилизацию.

3. *Block S. (ed.). Disinfection, sterilization and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia (1977).*
Сборник статей по всем способам стерилизации. Содержит детальные сведения о многих химических дезинфицирующих средствах. Представляет собой важный библиографический источник: имеет много полезных ссылок.
4. *Ernst R. R., Doyle J. E. Sterilization with gaseous ethylene oxide — a review of chemical and physical factors. Biotechnol. Bioeng, 10, 1—31 (1968).*
5. *Gaughran E. R. L., Goudie A. J. (ed.). Technical developments and prospects of sterilization by ionizing radiation, vol. 1. Multiscience Publication, Ltd., Montreal (1974).*
Обзор по оборудованию и приспособлениям, используемым для стерилизации облучением. Содержит некоторые сведения по системам дозиметрии и влиянию облучения на различные материалы.
6. *Keruluk K., Lloyd R. S. Ethylene oxide sterilization. American sterilizer Co., Erie, Pa. (1974).*
Хороший вводный курс, представляющий собой обзор основных принципов и практических рекомендаций. Содержит важную в историческом отношении библиографию.
7. *National Aeronautics and Space Administration. Biological handbook for engineers. NASA-CR-61237. George C. Marshall Space Center, Huntsville, Ala. (1968).*
Сжатый материал для тех, кто не связан с биологией. Служит хорошим введением в технику стерилизации.
8. *Perkins J. J. Principles and methods of sterilization in health sciences, 2nd ed. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill. (1976).*
Книга написана в основном для персонала больниц с акцентом на оборудование и процессы, связанные со стерилизацией паром. Даны некоторые сведения о стерилизации сухим жаром, а также стерилизации окисью этилена и другими химическими средствами.
9. *Pflug I. J. Microbiology and engineering of sterilization processes. University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition and School of Public Health (sponsored by the Parenteral Drug Association, Philadelphia, Pa.) (1977).*
Сборник статей по частным вопросам монтажа, доставки и проверки оборудования для стерилизации.
10. *Pflug I. J., Holcomb R. G. Principles of thermal destruction of microorganisms, p. 933—994. In Block S. S. (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia (1977).*
Полиое описание стерилизации влажным и сухим жаром с тщательно разбираемыми примерами постановки экспериментов.
11. *Pflug I. J., Odlaug T. E. Syllabus for a series of lectures and workshop sessions on the microbiology and engineering of sterilization processes. University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition and School of Public Health. University of Minnesota, Minneapolis (1977).*
Руководство по расчетам, часто применяемым при стерилизации

паром. Предназначено для тех, кто глубоко изучает стерилизацию.

12. *Phillips G. B., Miller W. S. (ed.). Industrial sterilization. Duke University Press, Durham N. C. (1973).*
Сборник статей с современными разработками по стерилизации в промышленности.
13. *Stumbo C. R. Thermobacteriology in food processing, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York (1973).*
Полная монография по вопросам стерилизации паром. Хороший библиографический источник.

23.7.2. Специальная литература

14. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. AAMI Standard-BIER/steam vessel (proposed). Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, Va. (1978).
15. *Bruch C. W. Developments in industrial microbiology, p. 8. American Institute of Biological Sciences, Washington, D. C. (1973).*
16. *Ernst R. R. Federal regulations and practical control microbiology for disinfectants, drugs and cosmetics. Special Publication No. 4, p. 55—60. Society for Industrial Microbiology, Linden, N. J. (1969).*
17. *Ernst R. R., Doyle J. E. Dev. Ind. Microbiol., 9, 293—296 (1969).*
18. *Feldsine P. T., Shechtman A. J., Korczynski M. S. Dev. Ind. Microbiol., 18, 401—407 (1977).*
19. *Fifield C. W. In: Block S. S. (ed.), Disinfection, sterilization and preservation, 2nd ed., p. 562—591. Lea and Febiger, Philadelphia (1977).*
20. *Fraenkel-Conrat H. Biochim. Biophys. Acta, 15, 307—309 (1954).*
21. Gelman Instrument Co. Gelman microfiltration systems. Gelman Instrument Co., Ann. Arbor, Mich. (1977).
22. *Hall L. B. Spacecraft sterilization technology, p. 25—36. NASA SP-108. George C. Marshall Space Center, Huntsville, Ala. (1966).*
23. *Halvorson H. O., Ziegler R. J. Bacteriol., 25, 101 (1932).*
24. *Han W. Y., Zhang H. I., Korchta J. M. Can. J. Microbiol., 22, 295—300 (1976).*
25. Health Industry Manufacturers Association. Medical device sterilization monograph. Report 78—4.1. Validation of sterilization systems. Health Industry Manufacturers Association, Washington, D. C. (1978).
26. Health Industry Manufacturers Association. Report 78—4.4. Biological and chemical indicators. Health Industry Manufacturers Association, Washington, D. C. (1978).
27. *Keruluk K., Gammon R. A., Lloyd R. S. Microbiological aspects of ethylene oxide sterilization. I. Experimental apparatus and methods. Appl. Microbiol., 19, 146—151 (1970).*
28. *Kaye S. Am. J. Hyg., 50, 289—295 (1949).*
29. *Kaye S., Phillips C. R. Am. J. Hyg., 50, 296—306 (1949).*
30. Millipore Corp. Detection and analysis of contamination. ADM-30 and ADM-40. Millipore Corp., Bedford, Mass. (1965).

31. Millipore Corp. Preparing sterile particle free fluids in the hospital pharmacy. AM303. Millipore Corp., Bedford, Mass. (1976).
32. Pall Corp. Field experience in testing membrane integrity by the forward flow test method. Pall Corp., Cortland, N. Y. (1974).
33. Pall Corp. The Pall pharmaceutical filter guide. Pall Corp., Cortland, N. Y. (1976).
34. *Pflug I. J.* In: Phillips G. B. and Miller W. S. (ed.), Industrial sterilization, p. 239—282. Duke University Press, Durham, N. C. (1973).
35. *Pflug I. J., Bearman J.* Treatment of sterilization process microbial survivor data in environmental microbiology as related to planetary quarantine. Progress report 9, NASA grant NGL 24-005-160. University of Minnesota, Department of Food Science and Nutrition and School of Public Health. University of Minnesota, Minneapolis (1974).
36. *Pflug I. J., Schmidt C. F.* Disinfection, sterilization and preservation, 1st ed., p. 63—105. Lea and Febiger, Philadelphia (1968).
37. *Phillips C. R.* Am. J. Hyg., 50, 280—288 (1949).
38. *Phillips G. B., Miller W. S.* Remington's pharmaceutical sciences, 15th ed., p. 1389—1404. Mack Publishing, Easton, Pa. (1975).
39. *Tulis J. J.* In: Phillips G. B. and Miller W. S. (ed.), Industrial sterilization, p. 209—238. Duke University Press, Durham, N. C. (1973).
40. *Walker J. F.* Formaldehyde, vol. 3, Van Nostrand, Reinhold, N. Y. (1964).

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ И ДЕЗИНФЕКЦИЯ

У. Баркли

Основной принцип лабораторной безопасности заключается в хорошей организации. При этом важно иметь полное представление о риске, возможном при работе с бактериями, знать механизмы, с помощью которых могут происходить опасные воздействия, использовать меры безопасности и способы, которые уменьшают возможность этих воздействий, и быть бдительными в отношении компромиссов и вероятных ошибок. Существует много различных источников, из которых интересующиеся данным вопросом могут получить более детальную информацию, чем представленная в этом разделе. Рекомендуемая литература включает в себя статьи общего характера по технике лабораторной безопасности [1—7], справочники и руководства по мерам безопасности [8—10], обзоры литературы по инфекциям в лабораторных условиях [11, 12], исследования специфической лабораторной работы [13—18] и работы общего характера по дезинфекции [19, 20].

24.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Пайк [11] опубликовал анализ 3921 случая инфекций, полученных в лаборатории, а примеры инфекций, вызванных действием бактерий, приведены в табл. 24.1. Из представленных данных следует, что работающие с бактериями подвержены риску заражения, но из них трудно сделать выводы о степени риска, поскольку отчеты о заражениях неполны, а число людей, подвергшихся риску, не указывается. Очевидность возможности бактериального заражения в лабораторных условиях, однако, требует соблюдения мер предосторожности при обращении с любыми бактериями независимо от того, «патогенны» они или нет.

Таблица 24.1. Сводные данные по бактериальным инфекциям, полученным в лабораториях [11]

Заболевание или возбудитель	Число случаев			Число летальных исходов
	в США	в других странах	общее число	
Бруцеллез	347	76	423	5
Сыпной тиф	61	195	256	20
Туляремия	216	9	225	2
Туберкулез	163	13	176	4
<i>Streptococcus</i> sp.	69	9	78	4
Лептоспироз	24	43	67	10
Шингеллез	49	9	58	0
Сальмонеллез	21	27	48	0
Возвратная лихорадка	19	26	45	2
Сибирская язва	40	5	45	5
Эризипелонд	32	11	43	0
Дифтерия	24	9	33	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	26	3	29	1
Крысный тиф	16	5	21	0
Сап	9	11	20	7
Сифилис	5	10	15	0
Холера	4	8	12	4
Чума	4	6	10	4
<i>Neisseria meningitidis</i>	6	2	8	1
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	2	6	8	0
<i>Clostridium</i>	3	3	6	0
Столбнячный токсин	1	4	5	0
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	—	5	0
<i>Serratia marcescens</i>	—	—	5	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	—	4	0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—	—	3	0
<i>Escherichia coli</i>	—	—	2	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	—	2	0
<i>Pasteurella multocida</i>	—	—	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	1	0
<i>Mycobacterium leprae</i>	—	—	1	0
<i>Bartonella bacilliformis</i>	—	—	1	0
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	—	—	1	0
<i>Vibrio fetus</i>	—	—	1	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—	1	0
Смешанная инфекция	4	1	5	0
Микоплазмы	—	—	4	0
Всего	1145	491	1669	69

Разные случаи бактериального заражения в лабораториях сгруппированы в табл. 24.2 по принципу известного или возможного источника. Случаи заражения,

Таблица 24.2. Распределение случаев заболевания по источнику бактериальной инфекции [11]

Источник инфекции	Случай	
	число	процент
Выявленное заболевание	378	22,7
Аэрозоль	101	6,1
Животное или эктопаразит	149	8,9
Материал клинических проб	90	5,4
Выброшенная стеклянная посуда	34	2,0
Животные во время аутопсии	56	3,4
Умышленное заражение	14	0,8
Возбудитель при постановке опытов с ним в лаборатории	381	22,8
Другие источники	7	0,4
Неизвестные или несообщенные	459	27,5
Всего	1669	100

причины которых известны, составляют менее 25 %, тогда как в 75 % случаев причины заражения неизвестны. В некоторых случаях по имеющейся информации можно предположить источник заражения только в 50 % сообщенных случаев.

Известные несчастные случаи, в которых были зарегистрированы заболевания среди лабораторного персонала, имеющего дело с бактериями, представлены в табл. 24.3. Эти случаи разнообразны, причем среди них не отмечено какого-либо преобладания одной или нескольких инфекций. Следует помнить, что при проведении большинства бактериологических экспериментов возникают аэрозоли, которые либо оседают на поверхностях, либо непосредственно вдыхаются работающими с ними. Отсутствие информации об источнике или причине многих лабораторных заражений часто объясняется тем, что образование аэрозолей остается незамеченным.

Меры предосторожности, которые следует соблюдать при работе с патогенными бактериями известных опасных групп, представлены в табл. 24.4. В ней указаны специальные защитные средства, в частности, для работы с бактериями групп 3 и 4 необходимы перчатки и фильтрующие маски. Фильтрующие маски необязательны, когда эти бактерии находятся в боксах класса III

Таблица 24.3. Известные происшествия в лабораториях, приведшие к бактериальному заражению [11]

Вид происшествия	Случай	
	число	процент
Прокол или разбрызгивание при работе с иглой и шприцем	83	22,1
Контакт с инфекционным материалом в результате проливания, разбрызгивания и т. д.	82	21,7
Повреждение осколком стекла или другим острым предметом	75	19,8
Засасывание через пипетку	67	17,7
Укус или царапина, полученные от подопытного животного или эктопаразита	41	10,8
Другие случаи	3	0,8
Не установлен	27	7,1
Всего	378	100

или класса I с встроенной передней закрывающейся панелью, оснащенной вмонтированными длинными резиновыми перчатками, или когда была проведена эффективная иммунизация сотрудников лаборатории, подвергающихся опасному воздействию. Иммунизация рекомендуется во всех случаях, если она доступна и эффективна. Подробную информацию об иммунизациях и рекомендации по их применению можно найти в книге «Лабораторная безопасность в центре по борьбе с инфекционными заболеваниями» [9].

Международный знак биологической опасности (рис. 24.1) употребляется для обозначения действительного или возможного присутствия биологической опасности, а также для обозначения оборудования, емкостей, комнат, материалов или экспериментальных животных, которые содержат или заражены жизнеспособными возбудителями. Плакат с этим знаком можно приобрести (Interex Corp., Waltham, MA 02154; Nuclear Associates Inc., Westbury, NY 11590; Shamrock Scientific Specialities Systems, Inc. Bellwood, IL 60104) и вывесить вместе с соответствующей информацией. Знак окрашен люминесцирующей оранжевой или оранжево-красной краской. К цвету фона никаких требований не предъявляется; он должен быть лишь достаточно контрастным, чтобы знак ясно выделялся. Знак должен

Таблица 24.4. Рекомендаций по мерам безопасности при работе с патогенными бактериями

Бактерии	Применение методов асептики и приемов биологической безопасности	Биологически безопасные боксы	Специальные приспособления	Специальное защитное оборудование	Действенность иммунизации
Группа 1 ^a)	+	—	—	—	—
Группа 2 ^b)	+	—	—	—	+
Группа 3 ^c)	+	+	+	+	—
Группа 4 ^d)	+	+	+	+	+

^a 1-я группа бактерий: *Actinomyces* — все виды; *Arizona arizonae* — все серотипы; *Bordetella* — все виды; *Clostridium* — все виды кроме *C. botulinum* и *C. tetani*; *Corynebacterium* — все виды кроме *C. diphtheriae*; *Erysipelothrix insidiosa*; *Haemophilus influenzae*; *Klebsiella* — все виды; *Leptospira* — все виды; *Listeria* — все виды; *Mycobacterium* — все виды кроме *M. avium*, *M. bovis* и *M. tuberculosis*; *Neisseria gonorrhoeae* и *N. meningitidis*; *Pasteurella* — все виды кроме *P. multocida*; *Salmonella* — все виды кроме *S. typhi*; *Shigella* — все виды; *Staphylococcus aureus*; *Streptobacillus moniliformis*; *Streptococcus pneumoniae*; стрептококки групп А, В и D; *Treponema pallidum*; *Yersinia enterocolitica*.

^b 2-я группа бактерий: *Clostridium tetani*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Salmonella typhi*; *Vibrio cholerae*.

^c 3-я группа бактерий: *Bartonella* — все виды; *Brucella* — все виды; *Legionella*; *Mycobacterium avium*, *M. bovis* и *M. tuberculosis*; *Pasteurella multocida* (тип В); *Pseudomonas pseudomallei* и *P. mallei*.

^d 4-я группа бактерий: *Bacillus anthracis*; *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis*; *Yersinia pestis*.

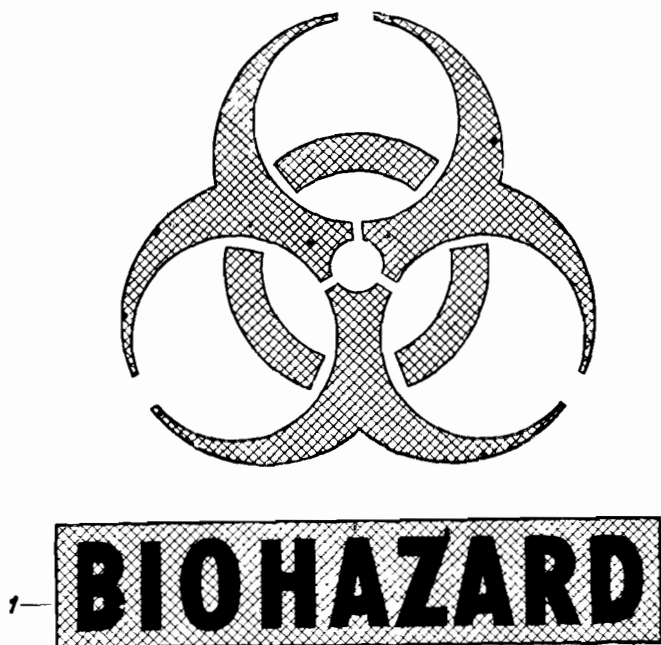
быть и заметен и практичен; он должен соответствовать по размеру тому оборудованию или материалу, к которому его прикрепляют, так чтобы его было видно отовсюду. Он указывает на действительную или возможную биологическую опасность. Рядом со знаком дается соответствующая информация о характере опасности, указывается фамилия ответственного за контроль над ней, а также меры, необходимые в случае аварии.

При работе с бактериями необходимо тщательно выполнять следующие меры предосторожности.

1. Держать двери лаборатории закрытыми.

2. Дезинфицировать рабочие поверхности ежедневно и каждый раз после проливания растворов, содержащих бактерии.

3. Перед мытьем или повторным употреблением загрязненные предметы, такие, как стеклянная посуда,



2—ADMITTANCE TO AUTHORIZED PERSONNEL ONLY

3 — Hazard identity: _____

4 — Responsible Investigator: _____

5 — In case of emergency call: _____

6 — Daytime phone _____ 7 — Home phone _____

8 — Authorization for entrance must be obtained from the responsible Investigator named above.

Рис. 24.1. Знак биологической опасности, предназначенный для вывешивания в местах возможного заражения. Перевод с англ.: 1 — биоопасность; 2 — вход разрешен только сотрудникам, имеющим допуск; 3 — вид опасности; 4 — ответственный; 5 — в экстренном случае звонить; 6 — рабочий телефон; 7 — домашний телефон; 8 — допускаются только получившие разрешение у ответственного.

клетки для животных и лабораторное оборудование, автоклавируют или дезинфицируют.

4. Использовать механические устройства для набора жидкости в пипетки.

5. Не есть, не пить и не курить в лаборатории.

6. Часто мыть руки и всегда — перед выходом из лаборатории.

7. Все процедуры и манипуляции выполнять осторожно, сводя к минимуму образование аэрозолей.

8. На соответствующих лабораторных дверях устанавливать знаки биологической опасности. Морозильники, холодильники и другие места хранения патогенных бактерий также должны быть снабжены этим знаком.

9. Надевать нательное лабораторное белье, защитную одежду или халаты. Не носить эту одежду вне лаборатории.

10. Избегать по возможности использования игл и шприцев.

24.2. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

24.2.1. Личная гигиена

Еду, конфеты, жевательную резинку и напитки нельзя хранить и употреблять в лаборатории. Курение должно быть запрещено. Нежелательно, чтобы работающие в лаборатории имели бороду, во-первых, потому что в бороде могут сохраняться частички с бактериями и, во-вторых, потому что маска или респиратор к чисто выбритому лицу прилегает гораздо лучше, чем к лицу с бородой. Руки не следует подносить близко ко рту, носу, глазам, лицу и волосам, чтобы предотвратить самозаражение. Личные вещи, такие, как пальто, шляпы, плащи, уличную обувь, зонты и кошельки, необходимо хранить вне лаборатории.

После снятия защитных перчаток следует немедленно вымыть руки. Проверочные опыты показывают, что, даже когда используют перчатки, не исключено попадание на руки бактерий. Бактерии могут проникнуть через незаметные маленькие дырочки, трещины или разрывы или попасть через край перчатки, прилегающий к запястью. Руки нужно мыть, сняв запачканную защитную одежду, перед выходом из лаборатории, перед едой или курением и в течение дня через интервалы, определяемые характером работы. Желательно мыть руки в

дезинфицирующем растворе или погружать их в него, но при этом, конечно, не следует допускать огрубения, чрезмерного высушивания или раздражения кожи.

К работе с бактериями нельзя допускать людей со свежим или старым порезом, ссадиной, повреждением кожи или любой открытой раной, включая образовавшуюся после удаления зуба.

24.2.2. Работа с пипетками

Чтобы уменьшить возможность заражения, следует использовать безопасные способы применения пипеток. Насасывание раствора пипеткой было причиной бактериального заражения в лабораторных условиях более чем в 17% всех известных случаев.

Наиболее распространенный способ, при котором подвергаются опасности в работе с пипеткой — это насасывание ртом. Бактерии могут также попасть в рот, если загрязненным пальцем дотронуться до верхнего конца пипетки. Кроме того, если в пипетках нет ватных пробок, то заражение может произойти путем вдыхания аэрозолей, возникающих в процессе работы с жидкими суспензиями, даже в том случае, когда жидкость не попадает в рот. Дополнительная опасность действия аэрозолей возникает, когда жидкость из пипетки капает на рабочую поверхность, перемешивают культуру чередованием всасывания и выдувания, интенсивно выдувают культуру в чашку или выдувают последнюю каплю из пипетки.

Чтобы использование пипеток было безопасным, применяют дополнительные приспособления, предотвращающие опасность заглатывания, и стараются обращаться с ними осторожно. Существует множество приспособлений к пипеткам — от простых шаровидных груш и поршневых насасывателей до сложных конструкций, имеющих свои собственные насосы, создающие вакуум. При выборе приспособления надо иметь в виду тип операции, которую требуется выполнить, легкость выполнения, а также ее точность. Обычно пользуются несколькими приспособлениями к пипеткам, так как не существует такого, которое годилось бы для всех случаев.

Предварительно следует отработать технику использования пипеток, чтобы уменьшить возможность обра-

зования аэрозолей. В верхнюю часть пипетки вставляют кусочки ваты и стараются избегать быстрого смешивания жидкостей путем чередования всасывания и выдувания их из пипеток. Нельзя с силой выдувать раствор из пипетки и допускать попадания пузырьков воздуха в жидкость, набираемую пипеткой. Предпочтительнее использовать пипетки, при работе с которыми не требуется выдувания последней капли. Необходимо также следить за тем, чтобы культуральный материал не капал из пипетки. Когда при работе с суспензиями, содержащими патогенные бактерии, применяют пипетки, на рабочую поверхность кладут полотенце, пропитанное дезинфицирующим веществом. Жидкость из пипеток выливают таким образом, чтобы кончик пипетки находился почти над уровнем жидкости или агара в сосуде-приемнике или раствор стекал по его стенке. Нельзя вносить раствор из пипетки в сосуд каплями, падающими с высоты. Грязные пипетки помещают в емкости с дезинфицирующим раствором, полностью погружая в него.

24.2.3. Применение шприцев и игл

Причиной наибольшего количества из всех известных случаев бактериальных заражений в лабораторных условиях является использование игл и шприцев. Для того чтобы уменьшить вероятность неблагоприятной инъекции, образования аэрозоля или проливания суспензий бактерий, лучше избегать их применения. Для введения суспензий бактерий животным через рот или нос рекомендуется пользоваться тупой иглой или канюлей на шприце и не рекомендуется применять шприц и иглу как заменитель пипетки.

Существуют следующие правила использования игл и шприцев для парентеральных инъекций.

Пользуются биологически безопасным боксом и избегают быстрых лишних движений рукой, державшей шприц.

Проверяют стеклянные шприцы на присутствие сколов и трещин, а иглы — на наличие зазубрин и проходимость. Это делают перед стерилизацией и перед употреблением.

Пользуются только шприцами с иглами (типа Люэр-Лок) и удостоверяются, что игла закреплена надежно.

Используют хирургические или другие резиновые перчатки.

Шприцы заполняют осторожно, чтобы в набираемом растворе было как можно меньше пузырьков воздуха и пены.

Излишки воздуха, жидкости и пузырьки удаляют, держа шприц в вертикальном положении, в ватный тампон, смоченный дезинфицирующим веществом, или в маленькую бутылочку, наполненную стерильной ватой.

Шприц не применяют для внесения инфекционной жидкости в открытый пузырек или пробирку с целью смешивания. Смешивание с помощью шприца разрешается только в том случае, если конец иглы находится ниже поверхности жидкости в пробирке.

Если раствор набирают шприцем из пробирки, то стараются не загрязнить втулку иглы, так как это может привести к попаданию инфекционного материала на пальцы.

Когда вынимают шприц и иглу из бутылки с резиновой пробкой, иглу и пробку заворачивают в ватный тампон, смоченный соответствующим дезинфектантом. Если есть опасность загрязнения дезинфектантом чувствительного к нему материала, используемого в эксперименте, применяют стерильный сухой тампон, который сразу же помещают в дезинфицирующий раствор.

Во время прививки животному руку держат сзади иглы во избежание укачивания.

Перед прививкой убеждаются в том, что животное хорошо фиксировано, и принимают меры предосторожности в случае неожиданных движений.

Место прививки перед инъекцией и особенно после нее протирают дезинфицирующим веществом.

После использования грязные стеклянные шприцы многократного пользования с надетыми на них иглами погружают в емкость с дезинфицирующим раствором и затем автоклавируют. Чтобы уменьшить возможность заражения, *иглы должны оставаться на шприцах до конца автоклавирования*. Шприцы с надетыми на них иглами помещают в отдельный лоток, в котором нет других использованных материалов.

Иглы и шприцы одноразового пользования помещают в лоток с дезинфицирующим раствором и затем автоклавируют. Емкости с надписью «Шприцы и иглы» после соответствующей упаковки и разрушения содержимого можно выбрасывать в обычный контейнер для отходов. После стерилизации иглы и шприцы специально портят и разбивают, чтобы их не использовали наркоманы.

В тех случаях, когда после использования иглу нужно поместить в защитный футляр, ее берут пинцетом, чтобы уменьшить вероятность случайного укола пальца. При взятии образцов крови предпочтительнее пользоваться вакуумными трубочками.

Шприцы и иглы многократного и одноразового пользования складывают в отдельные лотки с дезинфектантом, чтобы не возникало **проблемы** их сортировки. Шприцы и иглы никогда не кладут в лотки, содержащие пинетки и другую стеклянную посуду.

24.2.4. Вскрытие емкостей

С пробирками, содержащими бактериальные суспензии, необходимо обращаться осторожно. Такие простые операции, как удаление пробки из пробирки или пере-

несение культуры из одной емкости в другую, могут вызывать образование аэрозолей. Следует четко метить пробирки и штативы с пробирками, содержащими биологически опасный материал. Чтобы уменьшить проливание из разбитых пробирок, рекомендуется пользоваться безопасными подставками для пробирок вместо обычных штативов. В такой безопасной подставке каждая выемка для пробирки имеет достаточно высокие стенки, так что если пробирка разобьется, все ее содержимое останется в выемке. Аэрозоль с большим содержанием жидкости образуется при энергичном встряхивании жидких культур, тогда как при вращательном движении сосудов образование аэрозоля минимально, а получаемая суспензия достаточно гомогенна. По окончании ресуспендирования жидкой культуры следует несколько минут выждать и только затем открывать емкость; это способствует снижению образования аэрозоля.

Брызги аэрозоля могут появляться при погружении стерильной горячей петли или иглы в жидкую культуру или в косяк. Чтобы уменьшить образование аэрозолей, петле дают остыть либо на воздухе, либо при соприкосновении с внутренней стенкой емкости или поверхностью агара, где до этого заведомо не росла культура. После использования петли и иглы предпочтительнее стерилизовать в электрической или газовой печи, специально предназначенной для этой цели, а не нагреванием на открытом пламени. В таких печах имеется заслонка, задерживающая брызги. В продаже имеются петли для внесения инокулята одноразового пользования, которые проще обеззараживать погружением в дезинфицирующий раствор, чем нагреванием.

При посеве штрихом на неровную поверхность агара происходит вибрация петли или иглы, что приводит к образованию аэрозоля. Как правило, этой проблемы не существует, если посев делают на гладкую поверхность агара, поэтому рекомендуется не высевать культуру в чашки с неровной поверхностью агара.

Вода, появляющаяся в чашках Петри в результате синерезиса, образует в перевернутой чашке пленку между ребром чашки и крышкой в которой могут содержаться жизнеспособные бактерии. При открывании чашки эта пленка разрывается, в результате чего возникают аэрозо-

ли. Сообщающиеся с внешней средой пластмассовые чашки Петри, у которых крышка касается края чашки в трех точках, менее подвержены этой опасности. Уменьшает, но не предотвращает образование аэрозолей фильтровальная бумага, вставленная в крышки. Если чашки заведомо мокрые, то их следует открывать в боксе.

Менее вероятно высвобождение аэрозолей при открывании бутылей с завинчивающимися пробками или закрытых тампонами пробирок. Но все же это может произойти, когда во время открывания разрывается пленка между краем и прокладкой. Аэрозоли образуются при удалении ватных пробок или крышек с колб, бутылей и центрифужных стаканов сразу же после взбалтывания или центрифугирования. Опасно вынимать пробки, намокшие в результате невертикального положения колбы или центрифужного стакана. Пробки могут слегка увлажняться при центрифугировании, если в ходе его происходит незначительное вспенивание. В связи с этим все жидкие культуры с инфекционным материалом необходимо открывать в безопасном боксе, надев перчатки и лабораторную одежду с длинными рукавами.

Аэрозоль может образовываться при вскрытии запечатанной ампулы с лиофилизированной или жидкой культурой, поэтому ампулы следует вскрывать в безопасном боксе. Собирая осколки ампулы, необходимо позаботиться о том, чтобы не порезать перчатки или руки, чтобы разбитое стекло не попало в глаза, на лицо или не осталось неубранным. После вскрытия ампулы суспензия бактерий не должна загрязняться посторонними микроорганизмами или дезинфицирующими веществами. Этого добиваются, работая в безопасном боксе в перчатках. Для того чтобы вскрыть ампулу, прежде всего делают насечку пилкой около шейки ампулы. Саму ампулу оборачивают ватой, пропитанной дезинфицирующим веществом, и вскрывают надломом в месте насечки, предварительно убедившись, что держат ее вертикально. Другим способом в месте насечки делают трещину, прикладывая к нему накалившую проволоку или стеклянную палочку, затем оборачивают ампулу пропитанной в дезинфицирующем веществе ватой и открывают ее надломом. Вату и верхушку ампулы немедленно бросают в дезинфицирующий раствор. Содержимое

ампулы растворяют путем медленного добавления жидкости, стараясь не допускать образования аэрозоля. Раствор перемешивают, следя за тем, чтобы не было пузырьков, и переносят в приготовленную емкость.

Для удобства открывания выпускаются ампулы с предварительно нанесенной насечкой, однако такие ампулы менее надежны: они могут разбиваться во время работы с ними или при хранении. Ампулы с жидкими культурами вскрывают аналогичным образом.

Сбор культур, выращиваемых на куриных эмбрионах, весьма опасен. При его проведении сильно загрязняются скорлупа и подносы с яйцами, окружающая среда и руки экспериментатора. Работу подобного рода следует выполнять в безопасных боксах, часто пользуясь подходящим дезинфицирующим веществом.

24.2.5. Центрифугирование

При центрифугировании инфекционных бактериальных суспензий следует пользоваться безопасными центрифужными гильзами, а настольные центрифуги должны находиться в безопасных боксах класса I, имеющих панель с перчатками или окна для рук, которые можно открывать и закрывать.

Центрифужные стаканы и гильзы наполняют и открывают в безопасном боксе класса I. Если центрифугируют вне бокса, то применяют защитную гильзу. После заполнения и запечатывания ее протирают или окунают в дезинфицирующий раствор. По истечении необходимого времени гильзу обмывают чистой водой, поскольку некоторые дезинфицирующие вещества вызывают коррозию.

Перед центрифугированием проверяют стаканы, и если находят трещины или сколотые края, то такими стаканами не пользуются. Внимательно осматривают внутреннюю поверхность гильз и ликвидируют шероховатости или приставшие частицы. Проверяют также состояние резиновых прокладок.

Между стаканом и гильзой заливают дезинфицирующий раствор, чтобы в том случае, если разобьется стакан, материал подвергся дезинфекции. К тому же это создает хорошую амортизацию. Следует позаботиться о

том, чтобы культуральный материал не загрязнился дезинфицирующим веществом. Рекомендуется также не забывать о том, что если стакан разобьется, то из-за высокой концентрации клеток и большого разбавления дезинфицирующего вещества инфекционный материал может дезинфицироваться не полностью.

Надосадочную жидкость лучше не выливать из центрифужных стаканов, а отсасывать. Если ее необходимо слить, протирают внешний край стакана дезинфицирующим раствором, так как, если этого не сделать, на следующей стадии может образоваться аэрозоль. Отсасывают надосадочную жидкость с помощью вакуумной системы, содержащей безопасные емкости и фильтры.

Центрифужный стакан заполняют таким образом, чтобы край, крышка или ватная пробка не становились влажными от культуры. Завинчивающиеся крышки или крышки, охватывающие края сверху, безопаснее крышек, входящих внутрь. В последнем случае между крышкой и краем стакана обычно собирается некоторое количество жидкости. Даже стаканы с завинчивающимися крышками небезопасны: если края запачканы и неплотно прилегают к крышке, некоторое количество жидкости может попасть на внешнюю стенку стакана.

Не рекомендуется закрывать центрифужные стаканы алюминиевой фольгой, потому что при центрифугировании она часто слетает или рвется.

Стаканы и гильзы необходимо тщательно уравнивать. Не следует смешивать гильзы, стаканы и пластмассовые вкладыши из разных наборов. Если на этих предметах не указан вес, удобно пометить каждый комплект своей краской.

Металл, из которого сделаны высокоскоростные роторы, постепенно изнашивается, и если их используют на разных центрифугах, то для каждого заводят тетрадь, в которой отмечают количество часов работы на предельной или пониженной скорости. Если это не соблюдается, может произойти опасная и дорогостоящая поломка. Чтобы предотвратить коррозию или другие дефекты, которые могут привести к развитию трещин, необходимы частые проверки роторов, их очистка и сушка. Если ротор обрабатывают дезинфицирующим раствором, то после этого его промывают водой и вы-

сушивают. Регулярно проверяют состояние резиновых колец и крышек центрифужных стаканов и смазывают их в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Если стаканы сделаны из различных материалов (например, целлулоидные, полипропиленовые, из нержавеющей стали), следят за тем, чтобы использовались крышки, предназначенные для соответствующих типов. Крышки часто внешне похожи, но если их надевают на несоответствующие им стаканы, последние могут давать течь. При хорошем хранении стаканов и роторов и правильном с ними обращении этого не происходит.

24.2.6. Перемешивание и разрушение клеток

При использовании для разрушения бактерий смесителей, миксеров, ультразвуковых дезинтеграторов, коллоидных мельниц, струйных мельниц, дробилок, а также ступок с пестиками соблюдают следующие правила.

Используют биологически безопасный бокс.

Используют безопасные смесители, в которых предотвращена утечка жидкости в месте входа вращающейся оси в дно сосуда. В случае отсутствия защиты от утечки перед работой необходимо убедиться в том, что ее нет. Для этого проводят предварительные испытания, используя стерильную воду, физиологический раствор или раствор метиленового синего.

Во время работы на смеситель вешают полотенце, смоченное дезинфицирующим раствором. Сразу после работы смеситель и остатки стерилизуют.

Для смешивания инфекционных материалов стараются не использовать стеклянные емкости.

Иногда для предотвращения разрушения ножей и уменьшения нагревания содержимого требуется охлаждать емкость смесителя.

После прекращения работы смесителя емкость не открывают по крайней мере в течение 1 мин, давая возможность осесть аэрозолю.

24.2.7. Обращение с животными

Животные способны распространять патогенные микроорганизмы через слюну, мочу или экскременты. В отсутствие специальной информации все животные должны рассматриваться как разносчики инфекции. Чтобы уменьшить разнесение пыли и находящихся в клетке отходов, с ними обращаются очень осторожно. Используемые клетки, где содержались животные, стерилизуют автоклавированием вместе с отбросами, емкостями и поилками.

Когда кормят, поят или забирают из клеток инфицированных животных, надевают плотные перчатки. Нельзя передвигать предметы в клетке голыми руками.

При инъекции животным бактерий надевают защитные перчатки. Следует ограничить движения животных (например, с помощью специальной небольшой клетки для приматов) или ввести им успокаивающие средства, чтобы избежать распространения опасного биологического материала или заражения других животных и персонала.

Экспериментальные животные подвергаются воздействию аэрозолей бактерий в вентилируемых клетках, в безопасных боксах класса III или в комнатах, где персонал пользуется вентилируемыми костюмами.

Большую опасность представляют огромные клыки крупных обезьян. Они играют важную роль в передаче естественно возникающих опасных обезьяньих вирусных инфекций, так как обезьяны часто кусаются. Эти зубы должны быть затуплены или удалены хирургическим путем ветеринаром. Многие зоонозы, в том числе инфекционный гепатит и туберкулез, передаются от обезьян людям. Вновь поступившие животные могут быть заражены, и от них могут заразиться лица, находящиеся с ними в тесном контакте. Чтобы избежать этого, необходимо применять личные защитные средства и использовать клетки, приспособленные для содержания зараженных животных.

Двери в помещениях с животными всегда держат закрытыми, за исключением тех случаев, когда необходимо войти и выйти. В эти помещения нельзя допускать посторонних лиц.

В каждом помещении с животными должна находиться емкость с дезинфицирующим раствором, который следует ежедневно обновлять. Он предназначен для дезинфекции перчаток и рук, а также для общей дезинфекции. Руки, полы, стены и кормушки клеток регулярно моют проверенным дезинфицирующим раствором соответствующей концентрации.

Сточные желоба на полу помещений с животными периодически наполняют водой или дезинфицирующим раствором, чтобы газы, образующиеся в стоках, не поднимались вверх. Сбритые волосы и другие отходы нельзя

бросать в сточный желоб на полу, поскольку они засоряют канализационные трубы.

Необходимо выполнять инструкцию по контролю за насекомыми и грызунами в каждом помещении с животными и в местах, где хранится корм. Особое внимание обращают на то, чтобы живые животные, особенно мыши, не могли проникнуть к отходам.

Вскрытие зараженных животных производят в безопасном боксе. При этом поверх лабораторной одежды надевают хирургическую накидку, а на руки резиновые перчатки. Перед вскрытием шерсть животных обрабатывают подходящим дезинфицирующим раствором.

По окончании вскрытия весь биологически опасный материал помещают в подходящие емкости и немедленно стерилизуют, а грязные инструменты кладут на поднос и заливают дезинфицирующим раствором. Внутреннюю поверхность безопасного бокса и загрязненные поверхности дезинфицируют. Перед тем как снять с рук перчатки, их тщательно очищают в дезинфектанте, подготовив тем самым к стерилизации. Мертвых животных помещают в специальные непротекающие емкости, автоклавируют и надежно связывают перед кремацией.

24.2.8. Применение вакуумных систем

Вакуумная фильтрация суспензий и отсасывание культуральных сред и надосадочных жидкостей из центрифужных стаканов в приемные колбы — это обычные лабораторные процедуры. Чтобы предотвратить засасывание бактериальных аэрозолей или забрасывание жидкости в вакуумную систему, на пути к источнику вакуума устанавливают воздушный фильтр, а между приемной колбой и воздушным фильтром помещают колбу для забрасываемой жидкости.

На рис. 24.2 показаны два способа защиты вакуумной системы. В обоих патринообразный фильтр служит эффективным барьером, препятствующим проникновению аэрозолей в вакуумную систему. Обычно фильтры способны задерживать находящиеся в воздухе частицы размером 0,45 мкм или больше. К таким фильтрам относится, например, фильтр с фирменным названием Ultipor (DFA 3001 AXPL5; Pall Corp., Courtland,

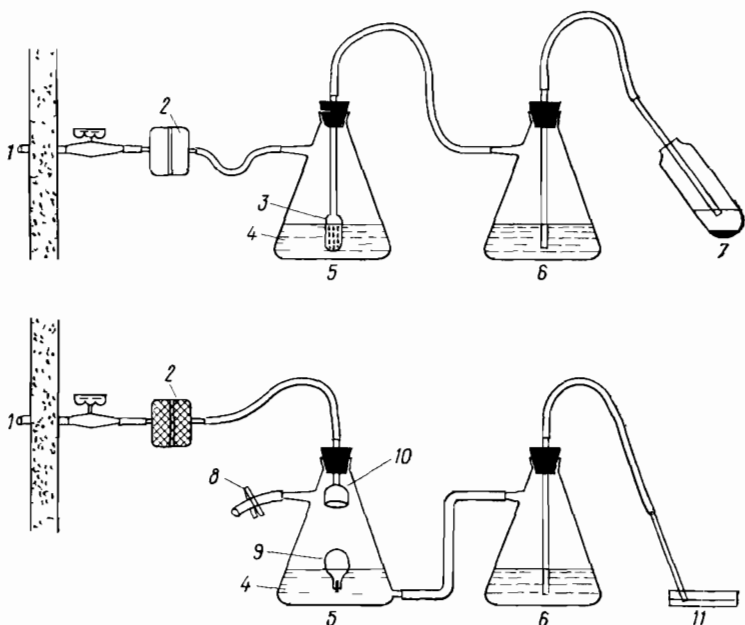


Рис. 24.2. Два способа защиты вакуумных систем от загрязнения. 1 — подвод вакуума; 2 — фильтр; 3 — стеклянный разбрызгиватель; 4 — дезинфицирующий раствор; 5 — колба для сбора забрасываемого материала; 6 — приемная колба; 7 — центрифужный стакан; 8 — зажим; 9 — резиновая груша; 10 — стеклянная воронка Бюхнера; 11 — чашка с культурой ткани.

NY 13045). При сборке любого аппарата используют гибкие резиновые шланги, хорошо прилегающие к стеклянным трубкам. Стенки резиновых шлангов должны быть достаточно толстыми, чтобы не возникало осложнений при работе с вакуумом. В качестве колб для забрасываемого материала используют колбы емкостью от 250 до 4000 мл в зависимости от имеющегося пространства и количества жидкости, которое может быть заброшено. Эти колбы должны содержать дезинфицирующий раствор. В них необходимо добавлять пеногасители (например, пеногаситель Доу Корнинг А), так как движение пузырьков воздуха через дезинфицирующий раствор может привести к тому, что пена достигнет

фильтра и нарушит вакуум. Если фильтр загрязнился или требует замены, то его и колбу можно безопасно удалить, перекрыв линию между фильтром и источником вакуума. Перед сменой фильтр и колбу обязательно автоклавируют. После этого в систему вставляют новый фильтр и приводят установку в исходное состояние.

24.2.9. Различные манипуляции

Водяные бани и бани с аппаратами Варбурга, используемые для инактивации, инкубирования бактерий или постановки опытов с ними, должны содержать дезинфицирующее вещество. Для бань с холодной водой рекомендуется использовать 70%-ный пропиленгликоль. *Предупреждение.* В качестве дезинфицирующего вещества не следует применять азид натрия, так как он взрывоопасен.

Морозильники, сосуды с жидким азотом, контейнеры с сухим льдом и холодильники необходимо периодически проверять, чистить и обеззараживать. Во время их чистки пользуются резиновыми перчатками и защитными респираторами. Все инфекционные материалы, хранящиеся в холодильниках или морозильниках, снабжают этикетками.

Откачивание воздуха из парового стерилизатора перед началом стерилизации зараженного материала может приводить к опасности попадания инфекционного материала в атмосферу. Эту опасность можно предотвратить, установив высокоэффективный воздушный фильтр для частиц (American Air Filter Co., Inc., Louisville, KY 40201; Cambridge Filter Corp., Syracuse, NY 13221; Flanders Filters Inc., Washington, NC 27889).

Опасные жидкие культуры или жизнеспособные порошковые инфекционные материалы в стеклянных сосудах следует транспортировать, инкубировать и хранить в удобных для обращения небьющихся непроницаемых контейнерах, достаточно больших для того, чтобы вместить всю жидкость или порошок в случае утечки содержимого или разбивания стеклянного сосуда.

Засеянные среды в чашках Петри или твердые среды в других емкостях переносят и инкубируют в непроницаемых лотках или контейнерах.

При получении стерильных фильтратов инфекционных материалов с помощью мембранных фильтров последними обращаются очень осторожно. Поскольку мембраны отличаются хрупкостью и в силу ряда других факторов, фильтраты считают инфекционными до тех пор, пока с помощью посева не будет доказана их стерильность.

Качалки тщательно проверяют с целью предотвращения разбивания колб или разрушения других емкостей. Используют прочные пластмассовые или толсто-стенные стеклянные колбы с завинчивающимися крышками и надежно закрепляют их на платформе качалки. В качестве дополнительной предосторожности можно поместить каждую колбу в пластмассовый мешок с поглощающим материалом или без него. Нельзя производить сопряженные с опасностью действия в одиночку

24.3. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕРЫ ПО ПРЕДОТВРАЩЕНИЮ ЗАРАЖЕНИЯ

Для уменьшения воздействий бактериальных аэрозолей используются биологически безопасные боксы. Они совершенно необходимы, поскольку большинство лабораторных процедур связано со случайным образованием аэрозолей, которые можно вдохнуть. Боксы помогают также предохранить пробы от загрязнения из воздуха. Используются три типа биологически безопасных боксов: классов I, II и III в порядке увеличения безопасности.

Биологически безопасные боксы классов I и II должны быть расположены на территории лаборатории в отдалении от входов и выходов, от систем подачи воздуха и активно используемых площадей, чтобы уменьшить неблагоприятные воздействия потоков комнатного воздуха. Лучше всего располагать бокс у боковой стены, в месте, наиболее удаленном от входной двери.

Работающие в боксах должны носить халаты с длинными рукавами и плотно прилегающими к руке манжетами, а также перчатки, чтобы уменьшить вероятность попадания микроорганизмов с кожи в рабочее пространство бокса и защитить руки от контактного заражения. Перед тем как в бокс поместить оборудование и мате-

риалы, его рабочая поверхность должна быть обеззаражена. Все необходимое следует вносить в бокс перед началом работы. В боксах класса II ничего нельзя ставить на вытяжных решетках спереди и сзади от рабочей поверхности.

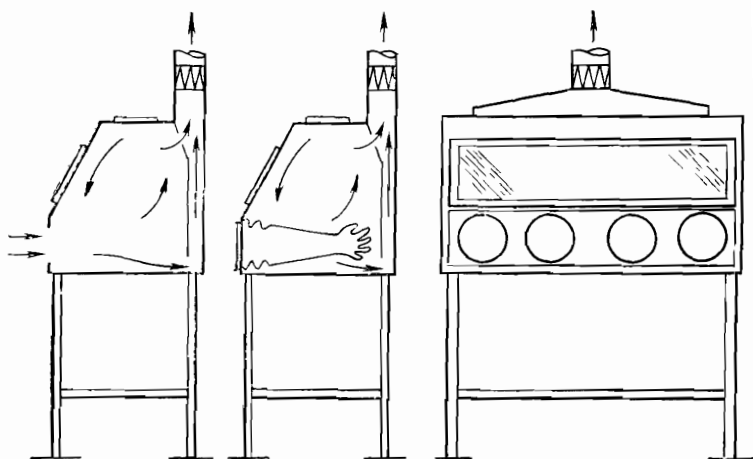
Важную роль играет расположение оборудования и материала на рабочей поверхности. Зараженные предметы должны быть отделены от чистых и расположены так, чтобы их не надо было переносить над чистыми. Использованные подносы необходимо класть сзади.

Для предотвращения контактного заражения следует выполнять правила асептики. Все инфицированные предметы перед удалением из бокса следует поместить в контейнер или продезинфицировать. Подносы с использованными пипетками и стеклянной посудой перед выносом из бокса накрывают. После удаления из бокса всех предметов рабочую поверхность обязательно моют.

24.3.1. Боксы класса I

Бокс класса I (рис. 24.3) используется в трех вариантах: с открытой по всей ширине передней частью, с встроенной передней панелью без перчаток или с панелью, снабженной длинными резиновыми перчатками. Материалы вносят в него и удаляют из него через отверстие в панели, через подвешенную на шарнире обзорную панель, если она есть, или через боковой воздушный шлюз. Приток комнатного воздуха предохраняет от выхода находящихся в воздушном пространстве бокса микроорганизмов. Воздух обтекает рабочее пространство, проходит над и под защитным экраном и выходит через высокоэффективный воздушный фильтр (ВЭВ-фильтр) и вентилятор в канал над боксом, ведущий в вытяжную систему здания или наружу. При работе с открытой передней частью требуется минимальная лобовая скорость поступления воздуха 22,9 м/мин.

Защита, обеспечиваемая боксами класса I, может быть нарушена резким отдергиванием рук, быстрым открыванием и закрыванием двери комнаты или быстрыми движениями за передней панелью бокса. При этом интенсивно образующиеся аэрозоли, несмотря на поступающий поток воздуха, могут попадать наружу.



a



б

Рис. 24.3. Схема (а) и внешний вид (б) биологически безопасного бокса класса I.

Кроме того, бокс класса I не предохраняет руки от контакта с биологически опасными материалами. Чтобы его избежать, нужно выбрать соответствующий метод работы и обязательно использовать перчатки и защитную одежду.

24.3.2. Боксы класса II

В боксах класса II (рис. 24.4) используются ламинарные потоки воздуха, в них имеются передние окна для доступа к рабочему пространству и для внесения и удаления необходимых предметов. Предотвращение распространения инфекционного материала из воздушного пространства бокса достигается завесой воздуха, образуемой из неотфильтрованного воздуха, поступающего из комнаты в бокс, а также из воздуха, идущего через верхнюю решетку и проходящего через ВЭВ-фильтр. Эта завеса предохраняет также от поступления загрязнений из комнатного воздуха в рабочее пространство бокса. Воздух затягивается через решетку у переднего края рабочей поверхности в находящийся внизу приточный вентилятор, проходит через ВЭВ-фильтр, подается к верхней решетке и через нее поступает в бокс. Часть воздуха используется для поддержания воздушной завесы, а оставшаяся часть проходит вниз и вытягивается через решетку, расположенную у заднего края рабочей поверхности. Отфильтрованный воздух, поступающий через верхнюю решетку, опускается вниз однородным потоком, что сводит к минимуму возникновение завихрений. Этот воздух обеспечивает и поддерживает чистую атмосферу рабочего пространства. Часть воздуха, вытягиваемого через переднюю и заднюю решетки рабочей поверхности, которая равна притоку комнатного воздуха в бокс, также фильтруется и удаляется из бокса.

Существуют два типа боксов класса II: А и Б. Боксы типа А имеют фиксированное переднее окно. Скорость потока поступающего через окно воздуха составляет по крайней мере 22 м/мин. Рециркуляция воздуха в боксе велика, она составляет около 70%. Бокс может работать в режиме рециркуляции, возвращая отфильтрованный воздух в комнату. Если нет необходимости удалять накапливающиеся тепло и запахи из использованного воз-

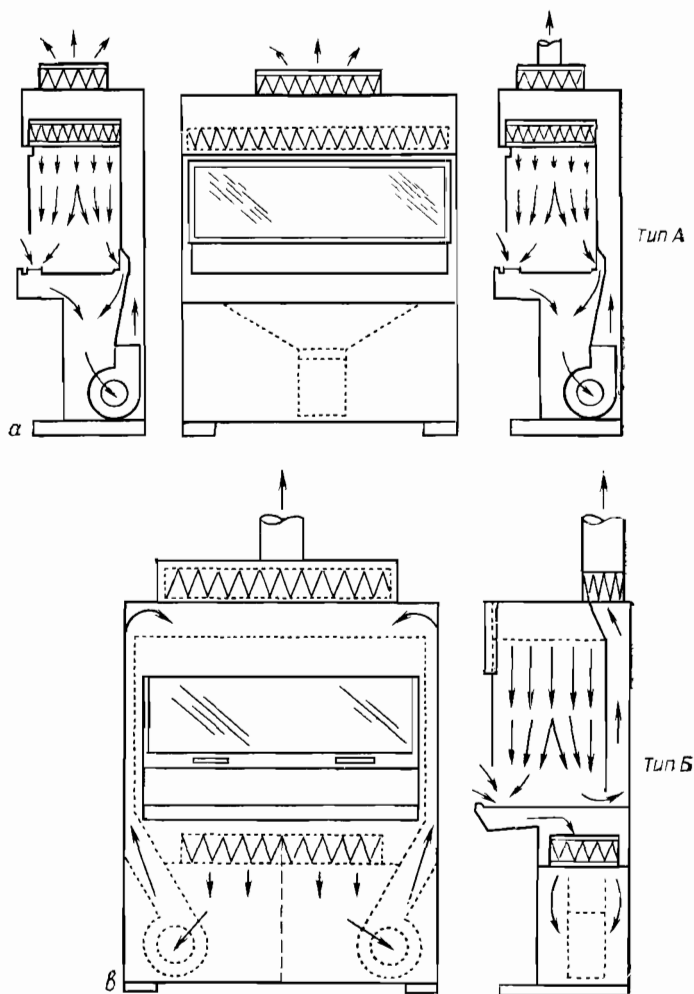
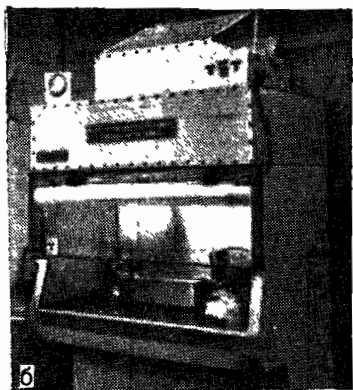
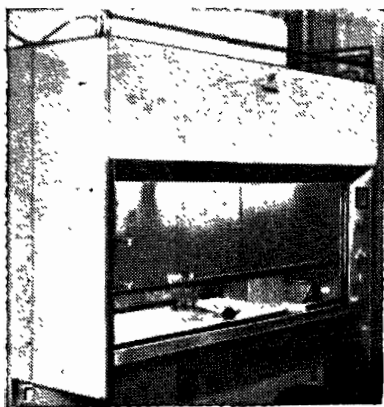


Рис. 24.4. Схема (а, в) и внешний вид (б, г) биологически безопасных боксов класса II.

духа, такой режим очень удобен, так как при этом сводятся к минимуму требования, предъявляемые к системам, поставляющим и вытягивающим воздух.



В боксах типа Б рециркуляция отработанного воздуха отсутствует. Они имеют вертикальные перемещаемые рамы, а не фиксированное окно, как в боксах типа А. При зазоре рамы 20 см скорость поступающего воздуха достигает 30,5 м/мин. Рециркуляция в этом боксе низка (около 30%). Боксы типов А и Б обеспечивают частичную защиту персонала, окружающей среды и экспериментальных материалов от заражения. В боксах типа Б можно работать с разбавленными препаратами химических канцерогенов, слабо радиоактивными материалами и летучими растворителями, когда поддерживается скорость поступающего воздуха 30 м/мин. Однако при работе с этими веществами необходимо точно знать их концентрации, которые не должны достигать опасного уровня. В противном случае возникают проблемы, связанные с устранением загрязнений. Боксы типа



А нельзя использовать для работы с высокотоксичными, взрывчатыми, воспламеняющимися или высокорadioактивными веществами, поскольку для них характерна интенсивная рециркуляция воздуха.

24.3.3. Боксы класса III

Боксы класса III (рис. 24.5) представляют собой полностью закрытую вентилирующуюся герметичную камеру. Манипуляции в них производятся с помощью

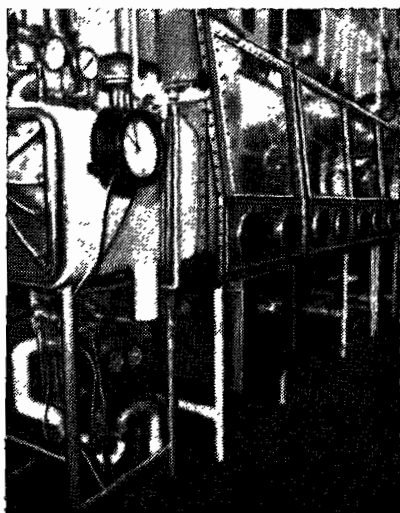
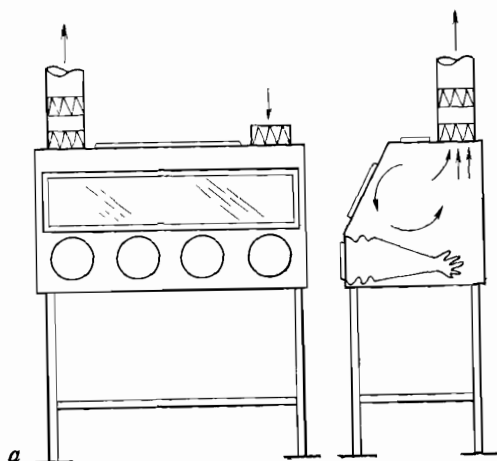


Рис. 24.5. Схема (а, б) и внешний вид (в) биологически безопасного бокса класса III.

прикрепленных к передней панели резиновых перчаток. Во время работы бокс находится под отрицательным воздушным давлением по крайней мере 1,3 см водяного столба. Воздух поступает в бокс через ВЭВ-фильтры. Удаляемый воздух проходит через два ВЭВ-фильтра, установленные последовательно. Боксы класса III имеют отдельные вытягивающие вентиляторы.

Материалы вносят и удаляют через стерилизаторы с двойными дверями и ванночки с раствором дезинфицирующего вещества. В качестве дезинфицирующих веществ можно использовать обычно применяемые средства, но только не газ. Модульные конструкции обеспечивают подсоединение к боксу холодильника, инкубатора, морозильника, центрифуги, камеры с животными, а также других специальных приспособлений.

Бокс класса III обеспечивает самый высокий уровень защиты персонала и окружающей среды. Однако защита может быть нарушена в случае прокола перчаток или в ситуациях, когда возникает положительное давление. В этом боксе нельзя работать с огнеопасными растворителями, если не показано, что их концентрации не достигают опасных пределов. Только в этом случае их можно вносить в бокс в закрытых небьющихся емкостях, но нельзя хранить там. Для работы в боксе класса III предпочтительнее электрические нагреватели.

24.4. ХИМИЧЕСКАЯ ДЕЗИНФЕКЦИЯ

Дезинфекция представляет собой удаление или разрушение патогенных микроорганизмов с неживых объектов или поверхностей обычно с помощью химического агента. Она проводится с целью обеспечить надежность результатов биологических исследований или предотвратить возникновение и распространение заболеваний. Во многих случаях химическая дезинфекция необходима, поскольку не всегда удастся применить наиболее надежный метод — стерилизацию паром, а также другие физические методы, например, когда имеют дело с большими пространствами, большими поверхностями и стационарным оборудованием. Кроме того, высокие температуры и влага часто портят точные приборы, особенно имеющие сложные оптические и электронные части.

24.4.1. Типы веществ

Существует множество дезинфицирующих веществ, имеющих помимо химических фирменные названия. Дезинфицирующие вещества классифицируют по группам: кислоты или щелочи, галогены, тяжелые металлы, четвертичные аммониевые основания, фенольные соединения, альдегиды, кетоны, спирты, амины и перекиси. К сожалению, чем активнее дезинфицирующее вещество, тем более вероятно, что оно обладает нежелательными свойствами, такими, как токсичность или способность вызывать коррозию. Не существует дезинфицирующего средства, которое было бы одинаково применимо и эффективно при любых условиях. Устойчивость микроорганизмов к действию дезинфицирующих веществ может существенно меняться в зависимости от таких факторов, как концентрация активного компонента данного вещества, длительность контакта, pH, температура, влажность и присутствие органического вещества.

Этиловый или изопропиловый спирт часто употребляют для дезинфекции поверхностей в концентрации от 50 до 70%. Однако эти вещества обладают медленным обеззараживающим действием (несколько минут) и не эффективны против спор.

Формальдегид для использования в качестве дезинфицирующего агента обычно выпускается как 37%-ный водный раствор газа (формалин) или как твердое полимеризованное соединение (параформальдегид). Формальдегид в 5%-ной концентрации является эффективным жидким дезинфектантом и применяется для стерилизации комнат или зданий. Однако формальдегид в значительной степени теряет дезинфицирующую активность при низких температурах, близких к 0°C, а его острый, раздражающий запах требует соблюдения предосторожностей при использовании растворов формальдегида в лаборатории.

Фенол сам по себе не часто используется как дезинфицирующее вещество. Он обладает неприятным запахом, а на обработанных поверхностях оставляет клейкий осадок. Однако фенольные соединения служат основой для ряда распространенных дезинфицирующих средств, которые эффективны против вегетативных клеток бак-

терий в больших разведениях и практически лишены запаха (например, *о*-фенилфенол). Однако фенольные соединения неэффективны против бактериальных спор.

Четвертичные аммониевые основания характеризуются сильными поверхностно-активными свойствами, что делает их хорошими очистителями поверхности. Они связываются белками, поэтому в присутствии последних разбавленные растворы четвертичных аммониевых оснований теряют эффективность. При их добавлении в суспензию бактерии имеют тенденцию слипаться в комки, которые разрушаются под действием анионных детергентов, таких, как мыло. В средних концентрациях они бактерицидны, но против туберкулезной палочки и спор не эффективны даже при высоких концентрациях. К достоинствам четвертичных аммониевых оснований относятся следующие: они не имеют запаха, не оставляют пятен, не вызывают коррозии металлов, устойчивы, недороги и относительно нетоксичны.

Хлор представляет собой универсальное дезинфицирующее вещество, активное против всех бактерий, включая бактериальные споры, и эффективное в широком диапазоне температур. Хлор легко соединяется с белком, так что в присутствии белков его следует брать в избытке. Свободный доступный хлор является активным элементом. Он представляет собой сильный окислитель и вызывает коррозию металлов. Растворы хлора постепенно теряют силу, поэтому перед использованием их следует готовить заново. В качестве основы хлорных дезинфицирующих средств используется гипохлорит натрия. Отличное дезинфицирующее вещество можно приготовить из отбеливателей, применяемых в домашних условиях и в прачечных и содержащих 5,25% или 52 500 ч. на млн. хлора, доступного для высвобождения. Если сделать разведение 1 : 100, то раствор будет содержать 525 ч. на млн. доступного хлора, а после добавления 0,7% неионного детергента получают очень хорошее дезинфицирующее вещество.

Иодофоры представляют наиболее распространенную группу дезинфицирующих средств, используемых в лабораторных условиях, а один из них — вескодин (Wescodyn) применяется, пожалуй, наиболее широко. Диапазоны разбавления вескодина, рекомендуемые фирмой-

изготовителем (West Chemical Products Inc., New York, NY 11101), составляют от 1 унции¹ на 5 галлонов воды (что дает 25 ч. на млн. доступного иода) до 3 унций на 5 галлонов воды (что дает 75 ч. на млн.). Такое небольшое количество вескодина связывается в присутствии постороннего белка, поэтому 0,0075%-ным раствором этого вещества можно эффективно обработать чистую поверхность или чистую воду, но в присутствии сколько-нибудь значительного количества белка такая обработка не дает желаемых результатов. Для мытья рук и обработки спор вескодин рекомендуется разбавлять в соотношении 1 : 10 в 50%-ном этаноле, что дает 1600 ч. на млн. доступного иода. При такой концентрации инактивация большинства бактерий происходит относительно быстро. В качестве дезинфицирующего средства эффективен спиртовой раствор (настойка) иода, правда, иногда он вызывает раздражение.

Тяжелые металлы не рекомендуются для использования как дезинфицирующие средства, поскольку препараты из ртути и других тяжелых металлов токсичны и в большей степени являются бактериостатическими, чем бактерицидными.

Перекиси в форме слабых растворов перекиси водорода полезны для очистки кожных покровов и ран, но их антимикробная активность незначительна. Как дезинфицирующее средство перекись можно использовать в высоких концентрациях при низких значениях pH.

24.4.2. Выбор вещества

Хотя идеального дезинфицирующего вещества не существует, при его выборе необходимо принимать во внимание следующие свойства.

Высокая активность — эффективность при больших разведениях в присутствии органических веществ.

Широкий спектр антимикробного действия — эффективность против грамположительных, грамотрицательных, кислотоустойчивых бактерий, спор, вирусов и грибов.

Устойчивость — сохранение эффективности после хранения в течение длительных периодов времени.

¹ 1 унция=28,35 г, 1 галлон (США)=3,78 л. — Прим. перев.

Гомогенность — обусловленная отсутствием распада активных компонентов.

Достаточная растворимость — растворимость в воде, жирах и маслах, необходимая для хорошего проникновения в клетки микроорганизмов.

Низкое поверхностное натяжение — позволяющее проникать в трещины и щели.

Минимум токсичности — неспособность вызывать острый и хронический токсикоз, аллергию и раздражения, отсутствие мутагенности, канцерогенности, тератогенности и светочувствительности.

Детергентная активность — способность растворять и удалять грязь и мелкие частицы.

Минимум воздействия на материал — небольшое или допустимое воздействие на металлы, дерево, пластмассы и краску.

Запах — имеющее приятный запах, не имеющее запаха или отбивающее запах.

Цена — относительно невысокая.

Эффективность процесса дезинфекции можно довести до максимума, если учесть следующие факторы.

Против микроорганизма, подлежащего инаktivации, следует подобрать подходящее дезинфицирующее вещество. Если микроорганизм не идентифицирован, выбирают вещество по возможности широкого спектра действия.

На поверхностях или объектах, подлежащих дезинфекции, следует уменьшить до минимума биологические загрязнения и содержание органических веществ.

Большинство химических дезинфицирующих агентов имеет ограниченную эффективность по отношению к бактериальным спорам, поэтому в присутствии спор необходимо увеличивать время их воздействия.

Дезинфицирующее вещество применяют в соответствующей концентрации; при неправильно выбранных концентрациях инаktivации может не произойти, а излишне концентрированные растворы могут проявить токсическое действие или повредить материалы. От концентрации агента зависит, будет ли действие бактериостатическим или бактерицидным.

Тщательно подбирают время воздействия или контакта, необходимое для дезинфекции.

Таблица 24.5. Обобщенные сведения о дезинфицирующих веществах, применяемых на практике

Вещество	Требования		
	разведение	время контакта, мин	
		вегетатив- ные формы бактерий	бактериаль- ные споры
Спирт ^{а)}	70—85 %	10	НЭ ^{б)}
Формальдегид	0,2—8,0 %	10	30
Глутаральдегид	2 %	10	30
Фенольные соединения	1,0—5,0 %	10	НЭ
Четвертичные аммониевые соединения	0,1—2,0 %	10	НЭ
Соединения хлора ^{е)}	500 ч. на млн. ^{с)}	10	30
Иодофор	25—1600 ч. на млн. ^{с)}	10	30

^{а)} В месте, защищенном от света и лишенном доступа воздуха. ^{б)} Не-эффективен. ^{с)} Эффективная концентрация галогена. ^{д)} Воспламеняется.

^{е)} Раздражает дыхательные пути.

Убеждаются в том, что концентрация вещества и время контакта соотнесены с температурой дезинфекции. В целом при более низких температурах требуются большие времена контакта, а при повышении температуры на каждые 10 °С эффективность увеличивается в два-три раза.

Вода, используемая для приготовления растворов дезинфицирующих веществ, должна быть соответствующего качества. Для некоторых веществ жесткость воды не должна превышать определенного предела (например, концентрация ионов кальция должна быть ≤ 300 —400 г на 1 млн.); в противном случае исчезают дезинфицирующие свойства раствора.

Полезно иметь данные о количестве органических веществ на обрабатываемом объекте, поскольку при их взаимодействии с дезинфицирующими агентами активный компонент фактически удаляется из раствора.

Одно-единственное дезинфицирующее вещество не может быть эффективным или практичным во всех слу-

Свойства					
эффективен при хранении в течение одной недели ^{a)}	вызывает коррозию	дает остаток после применения	инактивируется органическими веществами	раздражает кожу	раздражает глаза
+					+
+		+		+	+
+		+		+	+
+	+	+		+	+
+		+	+	+	+
	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+

чаях. При его выборе необходимо рассмотреть следующие вопросы.

Что представляет собой организм, на который направлено действие вещества (организм-мишень)?

Про какие дезинфицирующие вещества и в каких формах известно, что они инактивируют или можно ожидать, что инактивируют, организм-мишень?

Какова требуемая степень инактивации?

В какой среде находится организм, т. е. в простой или комплексной, на твердых или пористых поверхностях или в воздухе?

Какова наибольшая ожидаемая концентрация клеток?

Можно ли ожидать, что дезинфицирующий агент (жидкость, пар или газ) будет контактировать с организмами, и можно ли эффективно поддерживать контакт в течение определенного времени?

Какие ограничения следует учитывать в связи с совместимостью материалов?

Какова устойчивость дезинфицирующего агента в используемых концентрациях и требуется ли немедленное его приготовление или у экспериментатора достаточно времени, чтобы приготовить его в рабочих концентрациях непосредственно перед использованием?

В табл. 24.5 приведены практические требования и наиболее важные характеристики для нескольких категорий дезинфицирующих веществ, чаще других применяемых в бактериологической лаборатории. На практике концентрации веществ и времена контакта могут отличаться от рекомендуемых фирмами-изготовителями, поскольку при составлении рекомендаций предполагается, что бактерии в высокой степени защищены органическими примесями среды. Иногда применение дезинфицирующих растворов в указанных концентрациях и в течение указанного времени не обеспечивает стерильности. В каждом конкретном случае эффективность выбранного способа дезинфекции должна быть установлена самим экспериментатором.

24.4.3. Дезинфекция поверхности

Обычно дезинфекция пола находится в ведении хозяйственной службы здания. В лабораториях и других помещениях, где имеется инфекционный материал, дезинфекцию следует производить ежедневно, например, фенол-детергентной смесью в определенном разведении с использованием чистых швабр (двухведерная процедура). Одним и тем же раствором не следует дезинфицировать площадь более 93 м². Применяемый дезинфицирующий агент должен иметь широкий спектр действия в отношении бактерий, грибов, вирусов и кислотоустойчивых организмов. На его активность не должна заметно влиять жесткая вода, органические вещества или хлопчатобумажная ткань швабр.

Стулья, столы и крупное оборудование можно дезинфицировать, используя смесь дезинфектант — детергент в нужном разведении с помощью чистой ткани, губки или полотенца разового пользования. Поверхности некоторое время должны оставаться сырыми; их не следует протирать. Рассматривая возможность применения 0,5%-ных растворов гипохлорита, нужно пом-

нить, что они легко нейтрализуются в присутствии избытка органических веществ, обесцвечивают поверхности, а также вызывают сильную коррозию металлов.

24.4.4. Проливание бактериальных суспензий

При проливании бактериальной суспензии внутри биологически безопасного бокса опасность для персонала, находящегося в помещении, невелика. Тем не менее чтобы избежать распространения инфекции, рекомендуется сразу же провести химическую дезинфекцию, причем это делают при включенной вентиляционной системе бокса. Стены, рабочие поверхности и оборудование опрыскивают или протирают дезинфицирующим составом. Смесь дезинфектанта с детергентом очищает поверхности как от грязи, так и от бактерий. Подходящим в данном случае является 3%-ный раствор какого-либо иодофора (например, вескодин) или разведенный в соотношении 1:100 отбеливатель, используемый в домашнем хозяйстве (например, хлорокс), с добавлением 0,7% неионного детергента. Все процедуры выполняют в перчатках. Для обработки используют достаточное количество дезинфицирующего раствора так, чтобы он попал в сточные лотки и емкости под рабочей поверхностью. Поднимают переднюю решетку и поддон и протирают все поверхности. Протирают также сточный резервуар и дезинфицирующий раствор из него сливают в контейнер. Дезинфицирующий раствор, перчатки, обтирочную ткань и губки помещают в лоток и автоклавируют. При этом непродезинфицированными остаются лишь фильтры, вентилятор, воздушные ходы и другие внутренние части бокса.

Если требуется продезинфицировать бокс изнутри, то это делают с помощью газообразного формальдегида. Отвешивают 0,3 г хлопьевидного параформальдегида на каждый кубический фут (0,028 м³) пространства бокса и на электроплитке вносят его внутрь бокса так, чтобы питающий шнур плитки выходил наружу. Влажность внутри бокса поднимают примерно до 70%, выпаривая на плитке воду. Температуру нагрева плитки с параформальдегидом поддерживают на уровне 292°С. Окно бокса закрывают полиэтиленовой пленкой, закреп-

ляя ее клейкой лентой. Если воздух из бокса выходит в комнату, то к вытяжному отверстию бокса прикрепляют гибкий шланг и подводят его к вентиляционной решетке комнаты. Когда в здании используется система рециркуляции воздуха, шланг прикрепляют к открытому окну или двери. Если же воздух из бокса поступает непосредственно в вытяжную систему здания, то задвижку тяги закрывают. Для деполимеризации параформальдегида включают плитку. После того как деполимеризуется половина параформальдегида, примерно на 3 с включают вентилятор бокса, чтобы формальдегид распространился по всему объему. После полной деполимеризации вновь включают вентилятор на 3 с. Затем оставляют бокс по крайней мере на 1 ч. После этого открывают задвижку тяги бокса, обеспечивая поступление воздуха в гибкий шланг, разрезают полиэтиленовую пленку, закрывающую окно, и включают вентилятор бокса. Бокс вентилируют в течение нескольких часов, чтобы удалить все следы формальдегида.

Проливание потенциально опасного биологического материала в лаборатории вне биологически безопасного бокса может подвергнуть риску тех, кто там находится. Если это произошло, прежде всего надо избежать вдыхания любого материала, находящегося в воздухе, для чего задерживают дыхание и покидают лабораторию. Те, кто находился в помещении, предупреждают остальных об опасности и идут под душ или в раздевалку. Когда известно или есть подозрение, что заражена одежда, ее осторожно снимают, складывая зараженными местами внутрь, а затем кладут в мешок или загружают непосредственно в автоклав. Моют предположительно подвергшиеся заражению места, а также руки и лицо. Не заходят вновь в лабораторию в течение 30 мин, чтобы дать возможность осесть образовавшимся при пролипании каплям аэрозоля. Перед тем как войти в лабораторию, чтобы вымыть место, где была пролита суспензия, надевают защитную одежду (резиновые перчатки, обувь, которую можно автоклавируют, накидку и респиратор). Если суспензия была пролита на пол, не рекомендуется надевать хирургический халат, который может соприкасаться с полом при нагибании. Рядом с местом, где пролили суспензию,

ставят контейнер для отходов, переносят туда крупные куски зараженного материала и закрывают его крышкой. Место, где виден пролитый материал, и вокруг него осторожно поливают раствором гипохлорита, содержащим 1000 ч. на млн. доступного хлора, раствором иодфора, содержащим 1600 ч. на млн. иода или другим подходящим дезинфицирующим агентом. Обработку производят в течение 15 мин, избегая брызг. Затем бумажным или матерчатым полотенцем вытирают дезинфицирующий раствор и пролитый материал по направлению к центру. Грязные полотенца сразу же бросают в контейнер для отходов. Контейнер для отходов, особенно дно, протирают снаружи полотенцем, смоченным в дезинфицирующем растворе, и помещают его и другие материалы в автоклав для стерилизации. Снимают обувь, верхнюю накидку, респиратор и перчатки и стерилизуют их в автоклаве. Моют руки и лицо и, если можно, принимают душ.

24.4.5. Инструменты

Зараженные шприцы, инструменты, термометры, пипетки и стеклянная посуда перед новым использованием должны быть обеззаражены. Если возможно, конечную обработку следует проводить паром для жаропрочных предметов или окисью этилена для неустойчивых к нагреванию и чувствительных к влаге материалов. В тех случаях, когда перед употреблением необходимо обеззараживание, для дезинфекции используют раствор 2%-ного глутарового альдегида. Предметы полностью погружают в раствор на 20—30 мин. При этом полная безопасность не гарантируется, если предмет не был предварительно вымыт или если раствор уже использовали ранее. Перед повторным употреблением инструменты необходимо тщательно прополоскать в дистиллированной воде, а если они предназначены для работы в полости тела животного или на его поверхности, то в стерильной дистиллированной воде.

Лабораторные пипетки обеззараживают погружением в дезинфицирующий раствор, например 2%-ный о-фенилфенол, налитый в вертикальную или горизон-

тальную емкость. Стеклянную посуду погружают полностью. Перед использованием стеклянную посуду стерилизуют паром.

24.4.6. Руки

Для обычного мытья рук в лаборатории, когда не имеют дела с инфекционными агентами, можно применять разные моющие средства. Тщательное мытье рук в течение 15—20 с с вескодином приводит к сокращению числа бактерий более чем на 50%.

Мыло в кусках использовать не рекомендуется не только из-за грязи в мыльнице, но также потому, что некоторые микроорганизмы сохраняют жизнеспособность на мыле в течение некоторого времени. Если в резервуар с жидким мылом не добавлять предохраняющих средств, то там могут постепенно вырасти многочисленные популяции бактерий. В этом случае резервуар следует вымыть обычным способом и налить туда новое мыло. Порошковые и листовые мыла имеют то преимущество, что они не загрязняются бактериями и бактерии не способны расти на них.

Быструю дезинфекцию рук после загрязнения производят одним из следующих способов: 1) моют руки щеткой 30—60 с смесью вескодина и детергента и ополаскивают их водой; 2) моют руки щеткой 30—60 с смесью 4%-ного хлоргексидина и детергента и ополаскивают водой; 3) моют руки 20—30 с смесью фенольного дезинфектанта и детергента и затем ополаскивают водой (некоторые фенольные производные при слишком частом использовании в слишком больших концентрациях могут вызвать депигментацию смуглой кожи), 4) смачивают руки спиртом (50—70%) на 20—30 с, затем моют их щеткой с мылом в течение 10—15 с и ополаскивают водой.

Благодарности

Я благодарю участников Специального комитета по безопасности и охране здоровья, которые подготовили книгу под названием «Монография по лабораторной безопасности — дополнения к указаниям Национального

института здоровья для исследований рекомбинантной ДНК», вышедшую в июле 1978 г. Информация, представленная в этой главе, в основном опирается на материалы этой монографии

24.5. ЛИТЕРАТУРА

24.5.1. Общая литература

- 1 *Chatigny M A* Protection against infection in the microbiological laboratory Devices and procedures *Adv Appl Microbiol*, **3**, 131—192 (1961)
- 2 *Collins C H, Hartley E G, Pillsworth R* The prevention of laboratory acquired infections *Public Health Laboratory Service Monograph Series No 6* Her Majesty's Stationary Office, London (1974)
- 3 *Darlow H M* Safety in the microbiological laboratory, p 169—204 In *Noiris J R and Ribbons R W* (ed), *Methods in microbiology* Academic Press, Inc, New York (1969)
- 4 *Phillips G B* Microbiological hazards in the laboratory I Control, II Prevention *J Chem Educ*, **42**, A43—A48, **42**, A117—A130 (1965)
- 5 *Phillips G B* Control of microbiological hazards in the laboratory *Am Ind Hyg Assoc J*, **30**, 170—176 (1969)
- 6 *Songer J R, Sullivan J F* Safety in the biological laboratory *J Chem Educ*, **51** A481—A485 (1974)
- 7 *Wedum A G* Biohazard control p 191—210 In *Melby E C Jr and Altman N H* (ed), *Handbook of laboratory animal science*, vol 1, CRC Press, Inc, Cleveland (1974)

24.5.2. Справочники и руководства по безопасности

- 8 U S Public Health Service Classification of etiologic agents on the basis of hazard, 4th ed, p 1—13 Center for Disease Control Atlanta, Ga (1976)
- 9 U S Public Health Service Laboratory safety at the Center for Disease Control Department of Health Education and Welfare, Publication No CDC 77—8118 Center for Disease Control, Atlanta Ga (1977)
- 10 U S Public Health Service NIH biohazard safety guide GPO Stock No 1740—00383 U S Government Printing Office, Washington, D C (1974)

24.5.3. Лабораторные инфекции

- 11 *Pike R M* Laboratory associated infections summary and analysis of 3921 cases *Health Lab Sci*, **13** (2), 105—114 (1976)
- 12 *Pike R M, Sulkin S E, Shulze M L* Continuing importance of laboratory acquired infections *Am J Public Health*, **55**, 190—199 (1965)

24.5.4. Специфические лабораторные действия

13. *Grieff D.* Safe procedure for opening evacuated glass ampoules containing dried pathogens. *Appl. Microbiol.*, 18, 130 (1969).
14. *Harvey R. W. S., Price T. H., Joynton D. H. M.* Observations on environmental contamination in a microbiological laboratory. *J. Hyg.*, 76, 91—96 (1976).
15. *Hellman A., Oxman M. N., Pollack R. (ed.).* Biohazards in biological research. In Proceedings of Conference held at Asilomar Conference Center, Pacific Grove, Calif., 22—24 January. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1973).
16. *Morris C. A., Everall P. H.* Safe disposal of air discharged from centrifuges. *J. Clin. Pathol.*, 25, 742 (1972).
17. *Phillips G. B., Jemski J. V.* Biological safety in the animal laboratory. *Lab. Anim. Care*, 13, 13—20 (1963).
18. *Reilman M., Wedum A. G.* Microbiological safety. *Public Health Rep.*, 71, 659—665 (1956).

24.5.5. Дезинфекция

19. *Block S. S.* Disinfection, sterilization and preservation, 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia (1977).
20. *Sykes G.* Disinfection and sterilization, 2nd ed. J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1967).

Часть VII

ПРИЛОЖЕНИЕ

Глава 25

РАСТВОРЫ ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ И ИЗМЕРЕНИЕ БИОМАССЫ

Ф. Герхардт

В этом приложении описывается ряд важных методов, применяемых в экспериментах, описанных в предыдущих главах.

25.1. РАСТВОРЫ ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ

Иногда при микроскопировании, измерении числа клеток, изучении генетических и метаболических свойств, а также для предварительной отмывки густые суспензии бактерий требуется довольно сильно разводить. При этом важно, чтобы клетки сохраняли свои исходные характеристики, особенно жизнеспособность и уровень обменных процессов. В разведенных суспензиях клетки легче подвергаются вредным воздействиям со стороны неблагоприятной для них среды, чем в концентрированных суспензиях, для которых характерно высокое содержание в среде веществ, поступивших туда из клеток. В связи с этим состав раствора для разведения следует предварительно подобрать.

В качестве такого раствора, как правило, нельзя использовать дистиллированную или водопроводную воду, поскольку она гипотонична по отношению ко всем (за исключением покоящихся спор) бактерияльным клеткам и не обладает буферными свойствами. Физиологический раствор (0,85%-ный NaCl) обычно также не подходит для разведения, поскольку он не забуферен и изотоничен только по отношению к клеткам млекопитающих. По тем же причинам не годится обычно и фосфатный буфер. При разведении такими растворами жизнеспособность клеток может упасть на 50% или более.

Как правило, в качестве раствора для разведения применяют фосфатно-солевой буфер с желатиной. При-

существование белка стабилизирует чувствительные к механическим повреждениям бактерии и фаги, а фосфат благодаря своим буферным свойствам способствует сохранению pH около 7,0. В состав фосфатно-солевого буфера входит 8,5 г NaCl, 0,3 г безводного K_2HPO_4 , 0,6 г безводного Na_2HPO_4 , 0,1 г желатины и дистиллированная вода объемом до 1 л.

Еще лучшими свойствами обладает раствор, применяемый для разведения в общих целях, который имеет состав: 0,4 М NaCl (или 0,5 М сахарозу) для создания осмотического равновесия, 50 мМ фосфатный буфер с pH ростовой среды (разд. 6.1.2), 50 мМ MgSO_4 для сохранения целостности мембран и 0,01% желатины в качестве стабилизирующего фактора (последняя может быть исключена, если почему-либо не подходит для работы с данными клетками). Этот раствор особенно хорош для грамотрицательных бактерий, которые легче повреждаются, чем грамположительные. Другие соображения по поводу растворов для разведения, применяемых при отмывке бактерий, приводятся в разд. 10.4.2 и 19.1.1.

В критических и необычных случаях раствор следует подбирать специально. Если нужно задержать рост клеток, в качестве лучшего раствора для разведения может послужить питательная среда без источников углерода. При использовании солевого буфера с желатиной, как правило, требуется корректировка pH и осмотического давления. Для многих анаэробных бактерий раствор для разведения должен содержать какой-нибудь восстановитель и в нем не должно быть растворенного кислорода (разд. 6.6.3 и 6.6.4). При работе с микроорганизмами могут возникать проблемы, связанные с адсорбцией бактериальных клеток на поверхности стеклянной посуды (см. Введение к гл. 11). Трудности могут появиться и при электроподсчете клеток (разд. 11.1.2), а также в других случаях, когда, например, клетки не расходятся после деления или агрегируют благодаря адгезивным свойствам поверхности или за счет электростатического заряда. Такие группы клеток иногда можно диспергировать путем физических воздействий — очень кратковременной обработкой ультразвуком или интенсивным перемешиванием в миксере

типа Vortex. При этом подсчитывают число жизнеспособных клеток и с помощью микроскопа следят за тем, чтобы диспергирование клеток было максимальным, а разрушение минимальным. Диспергированное состояние клеток поддерживают, а иногда его достигают, добавляя к раствору для разведения химический агент, который адсорбируется клетками и придает им отрицательный заряд, обуславливающий отталкивание. В качестве таких агентов рекомендуется добавлять детергенты (разд. 10.3.3), например 0,1% твина 80; однако эти вещества эффективны в основном для микобактерий или клеток с гидрофобной поверхностью и могут оказаться вредными для других клеток. Эффективными диспергирующими агентами, подходящими для обычно используемых в экспериментах бактерий, являются полимеризованные органические соли сульфоновых кислот алкил-арильного типа (соединения ряда лигнина) [5].

Растворы для разведения более подробно рассматриваются в работе Мейнеллов [6], а выживанию вегетативных форм микробов посвящен целый симпозиум [3].

25.2. ИЗМЕРЕНИЕ БИОМАССЫ

На измерении массы бактериальной клетки часто основываются измерения активности обмена веществ, а также изучение морфологических и химических особенностей компонентов клетки. Число клеток и биомасса — два самых существенных параметра бактериального роста, в то время как удельный вес — важная характеристика самой клетки.

Методы измерения биомассы представляются очевидными и прямыми. На деле же, если требуется высокая точность, они достаточно сложны. Результаты при этом могут быть выражены разными способами, а полученные величины являются скорее относительными, чем абсолютными. Об этом нельзя забывать при их определении.

25.2.1. Сырой вес

Номинальный (полный) вес сырых бактериальных клеток (сырой вес) из жидкой суспензии определяют

взвешиванием образца в таре с известным весом после отделения и отмывки клеток фильтрованием или центрифугированием. Однако и в том и в другом случае в интерстициальное (межклеточное) пространство захватывается раствор для разведения, вес которого входит в величину сырого веса биомассы, причем количество интерстициального раствора может быть существенным. В объеме, плотно заполненном жесткими сферами, на пространство между сферами приходится 27% общего объема. Для плотно упакованных бактериальных клеток интерстициальное пространство может составить от 5 до 30% в зависимости от их формы и степени деформации.

По одному из способов получения истинного сырого веса самих клеток из номинального сырого веса вычитают вес раствора, находящегося в межклеточном пространстве. Последний определяют экспериментальным путем, как описано в разд. 19.1.2. Согласно другому способу, для которого требуется специальное оборудование, клетки частично подсушивают и затем предоставляют им возможность перейти в равновесное состояние и набрать постоянный сырой вес в замкнутой камере для взвешивания, в которой поддерживается 100%-ная относительная влажность при постоянной температуре.

25.2.2. Сухой вес

Номинальный вес сухих бактериальных клеток (сухой вес), находящихся в жидкой суспензии, определяют после высушивания пробы в сушильном шкафу при 105°C до постоянного веса. Клетки должны быть промыты водой, в противном случае следует ввести поправку на компоненты среды или раствора для взвешивания, которые остаются в клетках при высушивании. Отделение клеток с помощью фильтрования осложняется некоторыми трудностями (разд. 10.5). Ряд проблем возникает при их высушивании в сушильном шкафу; при этом например, могут теряться летучие компоненты клеток или может происходить некоторая дегградация компонентов клетки, что хорошо заметно по обесцвечиванию (особенно при использовании высоких темпера-

тур). При переносе проб и взвешивании в комнатной атмосфере может происходить некоторое обратное поступление влаги. Поэтому все операции следует проводить быстро, в течение одного и того же времени для параллельных проб. Лучше всего, конечно, использовать сосуды для взвешивания с известным весом, которые после высушивания можно запечатать.

Наиболее точные измерения производят путем высушивания проб до постоянного веса в эксикаторе, содержащем пятиокись фосфора (P_2O_5), при $80^\circ C$ под вакуумом или лиофилизацией (разд. 12.2.1). Наш опыт свидетельствует о том, что результаты, получаемые этими тремя методами, не различаются в пределах 1% [2]. Превосходное обсуждение методик определения сухого веса и возможных ошибок дает Мэллит [4].

Сухой вес можно привести к единице сырого веса (граммы твердого вещества на 1 г биомассы клеток) или к единице сырого объема (граммы твердого вещества на 1 см^3 биомассы клеток или на 1 см^3 клеточной суспензии).

25.2.3. Содержание воды

Количество клеточной воды в полностью гидратированных клетках равно разности между сырым весом (разд. 25.2.1) и сухим весом (разд. 25.2.2) этих клеток.

Содержание воды можно также рассчитать с учетом влажности атмосферы или активности воды в растворе, где находятся клетки (разд. 6.2). Полностью высушенные клетки приходят в равновесие с атмосферой, влажность которой известна и контролируется, насыщаясь водой с постепенно возрастающей скоростью [7]. Этот процесс описывается типичной изотермой сорбции, представленной на рис. 25.1. Начальная фаза сорбции воды, происходящей при очень низких значениях влажности, соответствует прочному связыванию воды, поглощаемой в виде монослоя; фаза промежуточного плато соответствует непрочному связыванию воды, поглощаемой в виде множества слоев; конечная фаза, имеющая место при высоких значениях влажности, отражает поглощение большей части раствора — так называемой свободной воды. Общее количество воды в полностью

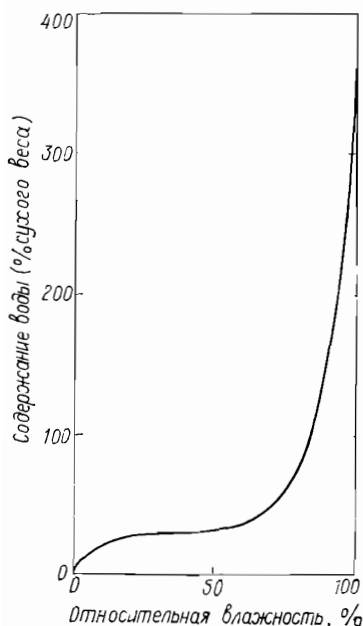


Рис. 25.1. Типичная изотерма сорбции воды для бактериальных клеток.

гидратированных клетках получают при 100%-ной влажности. Однако точное измерение этого количества затруднено в связи с крутым наклоном изотермы сорбции.

Оценивать количество клеточной воды иногда удобно, измеряя количество проникших в клетки D_2O , ^{14}C -мочевины или ^{14}C -глицерина (разд. 19.1.5) с учетом поправки на межклеточное пространство.

Количество клеточной воды можно привести к единице сырого веса (граммы воды на 1 г сырого веса), к единице сухого веса (граммы воды на 1 г обезвоженных клеток) или к единице сырого объема (граммы воды на 1 см³ биомассы клеток). Бактериологи чаще всего используют приведение к единице сырого веса,

хотя наиболее фундаментальным является приведение к единице сухого веса. Переход от содержания воды по отношению к сухому весу ($CB_{сух}$) к содержанию воды по отношению к сырому весу ($CB_{сыр}$) выражается уравнением: $CB_{сух} = CB_{сыр} / (1 - CB_{сыр})$. К примеру, 400%_{сух} = 80%_{сыр}.

25.2.4. Объем

Объем биомассы клеток (или средний размер отдельной клетки) лучше всего определяется по методике, описанной в разд. 19.1.

25.2.5. Плотность сырого и сухого вещества

Плотность вещества бактериальной клетки (собственно удельный вес) определяют либо как плотность сырого вещества, рассчитываемую на полное содержание твердых и жидких компонентов, либо как плотность сухого вещества («химическая плотность»), рассчитываемую на содержание только твердых компонентов. Обе величины выражаются в единицах веса, приходящихся на единицу объема (граммы на 1 см³).

Плотность сырого вещества получают простым делением сырого веса клеток (разд. 25.2.1) на занимаемый ими объем (разд. 25.2.4).

Сходным образом можно вычислить плотность сухого вещества, поделив сухой вес клеток (разд. 25.2.2) на занимаемый сухими клетками объем. К сожалению, этот объем трудно определить точно. Сначала клетки полностью высушивают, например лиофилизацией (разд. 12.2.1). Чтобы удалить поглощенный газ и остаточные пары воды, довольно большие количества (больше 2 г) высушенных клеток выдерживают в условиях высокого вакуума до тех пор, пока давление не выйдет на постоянный уровень при значениях меньше, например, чем 0,01 мкм рт. ст. (~1,33 мПа). Затем с помощью адсорбционного волюметра измеряют объем инертного или непоглощаемого клетками газа (например, гелия или азота), который выходит из них. Этот метод был испытан Берлином и др. [1] на бактериальных спорах. Соответствующее оборудование имеется в продаже (Fekrumeter; Gallard-Schlesinger, Inc., Carle Place, NY 11514).

Плотность сухого и сырого вещества оценивают с помощью равновесного центрифугирования в градиенте плотности (разд. 5.2.3). Однако использование этого метода для клеток, а не для субклеточного материала сопряжено со скрытыми трудностями. При определении таким способом плотности сырого вещества гидратированных клеток (например, в растворах метризида и ренографина) активность воды и осмотическая сила имеют по ходу градиента разные значения; к тому же градиентный раствор может проникать в водное пространство матрикса клеточной стенки. При определении

ЭТИМ СПОСОБОМ ПЛОТНОСТИ СУХОГО ВЕЩЕСТВА ВЫСУШЕННЫХ ЛИШЕННЫХ ГАЗА КЛЕТОК (с использованием таких пар растворителей, как перхлорэтилен и 4-трет-бутилтолуол) градиентный раствор может экстрагировать липиды клетки или сам растворяться в них.

25.3. ЛИТЕРАТУРА

1. Berlin E., Curran H. R., Pallansch. Physical surface features and chemical density of dry bacterial spores. J. Bacteriol., 86, 1030—1036 (1963).
2. Black S. H., Gerhardt P. Permeability of bacterial spores IV. Water content, uptake, and distribution. J. Bacteriol., 83, 960—967 (1962).
3. Gray T. R. G., Postgate J. R. (ed.). The survival of vegetative microbes. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 26, 1—432 (1976).
4. Mallette M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 1. Academic Press, Inc., New York (1969).
5. Marquis R. E., Gerhardt P. Polymerized organic salts of sulfonic acids used as dispersing agents in microbiology. Appl. Microbiol., 7, 105—108 (1959).
6. Meynell G. G., Meynell E. Theory and practice in experimental bacteriology, p. 25. Cambridge University Press, New York (1970).
7. Troller J. A., Christian J. H. B. Water activity and food. Academic Press, Inc., New York (1978).

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

Римской цифрой обозначен том,
арабской страница

- Acetobacter aceti* I: 215
Acholeplasma laidlawii I: 222
Acidaminococcus fermentans I: 217
Acinetobacter calcoaceticus I: 217; II: 66, 69—75
Actinobacillus lignieresii I: 215
Actinobifida dichotomica I: 220
Actinomyces bovis I: 220
Actinoplanes philippinensis I: 220
Aerococcus viridans I: 218
Aeromonas hydrophila I: 216
Agrobacterium radiobacter III: 29
Agrobacterium rhizogenes I: 215
Agrobacterium tumefaciens III: 29
Amoebacter roseus I: 213
Amorphosporangium auranticolor I: 220
Ampullariella regularis I: 220
Ancalomicrobium adetum I: 214
Aquaspirillum I: 228, 303—305, 308—309, 324
— *gracile* I: 228, 308—309
— *itersonii* III: 19
— *serpens* III: 19
Arachnia propinqua I: 220
Archangium gephyra I: 213
Arthrobacter terregens I: 220
Asticcacaulis excentricus I: 214
Azomonas III: 21
— *agilis* I: 215
Azospirillum I: 307—308; II: 69
Azotobacter I: 75—76, 200, 307—308, 325; III: 20, 21
— *chroococcum* I: 215
— *fastidiosus* I: 283
— *macerans* III: 15—16
— *pasteurii* I: 283—284
— *polymyxa* III: 15, 16
— *pumilus* III: 169
— *sphaericus* III: 34
— *stearothermophilus* III: 169
— *subtilis* I: 219, 299; II: 65—66; III: 43, 169
Bacterionema matruchotii I: 220
Bacteroides corrodens III: 22
— *fragilis* I: 216
— *melaninogenicus* III: 15
— *oralis* III: 15, 22
— *ruminicola* I: 216
Bartonella bacilliformis I: 221
Beggiatoa I: 286
— *alba* I: 213
Beijerinckia III: 21
Beijerinckia indica I: 215
Bifidobacterium bifidum I: 220
Bordetella pertussis I: 215, 301
Branhamella catarrhalis I: 217
Brucella melitensis I: 215
Butyribacterium rettgeri I: 206
Butyrivibrio fibrosolvens I: 216
Campylobacter fetus I: 214, 288, 301
Cardiobacterium hominis I: 216
Caryophanum latum I: 219
Caulobacter halobacteroides I: 214
— *henricii* I: 214
— *vibrioides* I: 214
Cellulomonas III: 17
— *flavigena* I: 220
Chlorobiaceae I: 291—294, 314—315
Chlorobium limicola I: 213
Chlorobium thiosulfatophilum I: 213
Chondromyces crotatus I: 213
Chromatiaceae I: 291, 293
Bacillus III: 75
— *cereus* I: 219

- Chromatium okenii* I: 213
Chromobacterium violaceum III: 14
Citrobacter freundii I: 216
Clostridium barkeri I: 219
Clostridium botulinum III: 42—43
Clostridium butyricum III: 29
Clostridium pasteurianum III: 74
Clostridium perfringens III: 29
Clostridium sporogenes III: 29, 169
— *tetani* I: 219, 284
Corynebacterium II: 308
— *bovis* I: 220
— *diphtheriae* I: 220, 297
Cystobacter fuscus I: 213
Cytophagales III: 32
- Dactylosporangium aurantiacum* I: 220
Dermatophilus congolensis I: 220
Derxia gummosa I: 215
Desulfotomaculum I: 313
— *acetoxidans* I: 314
— *nigrificans* I: 219
Desulfovibrio I: 313
— *desulfuricans* I: 217
- Edwardsiella tarda* I: 216
Enterobacter aerogenes I: 315, 316; III: 18, 28, 31, 35, 37, 45
— *cloacae* III: 12
Enterobacteriaceae I: 300—301, 516; III: 51—52
Erwinia amylovora I: 216
Erysipelothrix rhusiopathiae I: 219
Escherichia coli I: 199. См. также Кишечная палочка
Eubacterium saburreum I: 220
- Flavobacterium aquatile* I: 216
Flexibacter flexilis I: 213
Flexithrix dorotheae I: 213
Francisella tularensis I: 215
Fusiformis I: 207
Fusobacterium nucleatum I: 217
- Gallionella ferruginea* I: 214, 302
Geodermatophilus obscurus I: 220
Gluconobacter oxydans I: 215
- Haemophilus haemolyticus* III: 45
— *influenzae* I: 207, 216; II: 65
— *parainfluenzae* I: 216; III: 46
Halobacterium salinarum I: 215
Halococcus I: 300
Hyphomicrobium I: 333
— *vulgare* I: 214
Hyphomonas polymorpha I: 214
- Kitasatoa purpurea* I: 220
Klebsiella III: 82
— *pneumoniae* I: 216; III: 31
Kurthia zopfi I: 220
- Lachnospira multiparus* I: 217
Lactobacillus 30a I: 219
— *acidophilus* I: 219
— *arabinosus* I: 203
Lactobacillus bulgaricus I: 219
Lactobacillus casei I: 203, 219, 297
— *delbrueckii* I: 219
— *fermentum* I: 219
— *heterohiochii* I: 219
— *leichmannii* I: 219
— *plantarum* I: 219, 268, 297
— spp. I: 209, 261
Lampropedia hyalina I: 217
Leptospira canicola I: 214
— *grippotyphosa* I: 214
— *pomona* I: 214
Leptothrix ochracea I: 213
Leptotrichia buccalis I: 217
Leuconostoc mesenteroides I: 218, 261
Listeria monocytogenes I: 219, 279—280; III: 21
Lucibacterium harveyi I: 216

- Megasphaera elsdenii* I: 217
Methanobacterium ruminantium I: 218
Methanococcus vannielii I: 218
Methanosarcina methanica I: 218
Methylomonas methanica I: 215
Microbispora rosea I: 220
Micrococcus luteus I: 218
— *varians* III: 39
Microellobospora cinerea I: 220
Micromonospora chalcea I: 220
Micropolyspora brevicatena I: 220
Moraxella lacunata I: 217
Mycobacterium I: 207; II: 308; III: 10
— *phlei* I: 220
— *tuberculosis* H37 I: 221, 299
Mycoplasma mycoides I: 222
Myxobacterales III: 20, 32
Myxococcus xanthus I: 213
- Nannocystis exedens* I: 213
Neisseria gonorrhoeae I: 217, 302; II: 66
Neisseria meningitidis I: 217, 302
Neisseriae I: 302
Nitrobacter I: 198
— *winogradskyi* I: 217
Nitrococcus mobilis I: 217
Nitrosococcus nitrosus I: 217
Nitrosolobus multiformis I: 218
Nitrosomonas europaea I: 218
Nitrospira briensis I: 218
Nitrospina gracilis I: 218
Nocardia II: 308; III: 10, 20, 43
— *asteroides* I: 221
- Oceanospirillum* I: 303—304
- Pasteurella multocida* I: 216
Pediococcus I: 261
— *cerevisiae* I: 202, 218
Pedomicrobium ferrugineum I: 214
Pilimelia terevasa I: 221
Planobispora longispora I: 221
Pleurocapsales I: 290
- Propionibacterium acnes* I: 221
— *freudenreichii* I: 221
Prosthecomicrobium pneumatium I: 214
Proteus I: 299
— *rettgeri* III: 14
— *vulgaris* I: 216; III: 12, 22—27, 30, 37, 39, 44
Pseudomonas acidovorans I: 312; III: 14, 41
— *aeruginosa* I: 215, 312; III: 28, 30, 34, 37, 40—41
— *aureofaciens* III: 42
— *chlororaphis* III: 42
— *fluorescens* I: 215, 312, 316; III: 21
Pseudomonas lemoignei I: 215; III: 39—41
— *maltophilia* I: 215
— *putida* I: 215, 312; III: 30
— *testosteroni* I: 215
Pseudonocardia thermophila I: 221
- Rhizobium* I: 200
— *leguminosarum* I: 215
Rhodomicrobium vannielii I: 213
Rhodopseudomonas acidophila I: 292
— *capsulata* I: 292
— *gelatinosa* I: 292
— *palustris* I: 292
— *sphaeroides* I: 213, 292
Rhodospirillaceae I: 290—291, 325—326
Rhodospirillum fulvum I: 292
— *rubrum* I: 213, 292
— *tenue* I: 292
Rickettsia quintana I: 221
Rothia denocariosa I: 221
Ruminococcus flavefaciens I: 218
- Salmonella typhi* I: 299
— *typhimurium* I: 216; II: 49, 53, 464
Saprospira grandis I: 213
Sarcina ventriculi I: 218
Selenomonas sputigena I: 217

- Serratia marcescens* I: 216; III: 30, 35
Shigella dysenteriae I: 216
Sphaerotilus I: 305—306, 344
— *natans* I: 213
Spirillospora albida I: 221
Spirillum volutans I: 214, 285—286
Spirochaeta stenostrepta I: 214
Spiroplasma citri I: 222
Sporichthya polymorpha I: 221
Sporocytophaga I: 344
— *myxococcoides* I: 213, 294—295
Sporolactobacillus inulinus I: 219
Sporosarcina ureae I: 219
Staphylococcus aureus I: 218; III: 18, 39
— *epidermidis* II: 134; III: 18, 37—39
Stigmatella aurantiaca I: 213
Streptobacillus moniliformis I: 216
Streptococcus agalactiae III: 25—26
— *dysgalactiae* III: 15
— *equinus* I: 218, 261—262, 263—264
— *faecalis* I: 199, 202, 206, 218; III: 12, 15
— *lactis* I: 297; III: 16
— *mitis* I: 297; III: 12
— *pneumoniae* I: 318; II: 65; III: 15, 37
— *pyogenes* I: 218; III: 14, 26
— *salivarius* I: 297; III: 12, 15
— *sanguis* II: 65—66
— spp. I: 261
Streptomyces albolongus I: 221
— *aureofaciens* I: 221
— *erythraeus* I: 221
— *griseus* I: 221
— *niveus* I: 221
— *noursei* I: 221
— *venezuelae* I: 221
Streptosporangium roseum I: 221
Streptothrix hyalina I: 213
Streptoverticillium baldacii I: 221
Succinimonas amycolytica I: 217
Succinivibrio dextrinosolvens I: 217
Sulfolobus acidocaldarius I: 218

Thermoactinomyces vulgaris I: 221
Thermomonospora curvata I: 221
Thermoplasma acidophilum I: 222
Thermus aquaticus I: 280
Thiobacillus thiooxidans I: 218, 297, 347
— *thiiparus* I: 218
Treponema I: 284—285

Veillonella parvula I: 217
Vibrio cholerae I: 216, 296
— *parahaemolyticus* I: 296; III: 21, 36

Xanthomonas campestris I: 215

Yersinia pestis I: 216, 300, 318

Zymomonas mobilis I: 216

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсорбционная фотометрия II: 168—178
Автолиз, рост бактерий I: 376
Агар BMS, состав I: 328
— глюкозо-триптоновый I: 332
— градиентный в чашках II: 29—30
— для бруцелл I: 330
— — салмонелл и шигелл I: 343
— — стандартных методов I: 344
— Е I: 331
— железосульфидный I: 338
— желточный III: 74—75
— использование отвердителей I: 356—359
— как субстрат для факультативных анаэробов I: 309
— картофельный I: 328
— кровяной III: 70—71
— — с цистеином и теллури-
том I: 330—331
— LC для верхнего слоя II: 59
— Мак-Конки I: 335
— минеральный I: 338
— многослойный, пригото-
вление I: 464
— MPSS I: 339
— по Борде — Жангу I: 329
— — Кристенсену III: 73
— PY III: 79—80
— с антибиотиками II: 58
— — ацетатом таллия I: 345
— — бриллиантовой зеленью
I: 329
— — дрожжевым экстрактом
и маннитом I: 350
— — желчью и фиолетовым
красным I: 348
— солевой с маннитом I: 335—
336
— стрептомициновый II: 60
— Тейера — Мартина I: 345—
347
— TCBS I: 345
— фенилэтаноловый I: 342
Агаровая пластинка I: 46—47
Агарозо-аффин-гель, получение
II: 219—220
Агглютинация, тесты III: 64
Агенты, излечивающие клетки
от плазмид II: 24—25
Адсорбционная хроматография
II: 202—205
Адсорбция I: 478
— бактерий на поверхности I:
449
Азот, потребность в нем бак-
терий I: 200
— субстрат для *Azospirillum* и
Azotobacter I: 307—308
Азотистая кислота, мутаген II:
22—23
Азотсодержащие соединения,
анализ II: 340—348
— — методики определения
II: 350—366
Азотфиксация, нитрогеназная
активность III: 59—64
Активность воды I: 173—175
Актиномицеты, выделение I:
319
— и родственные им бактерии,
среда и культивирование I:
220—221
Алкилирующие агенты как му-
тагены II: 23
Аллостерическая регуляция
ферментативной активности
II: 406, 408—411
Алциановый синий, окрашива-
ние I: 82
Американское бактериологиче-
ское общество I: 12
п-Аминобензойная кислота, по-
требность в ней бактерий I:
202
Аминокислоты, количественное
определение по росту куль-
туры I: 261—267
— потребность в них бакте-
рий I: 207—208
2-Аминопурин как мутаген II:
18, 20

- Аммиак как субстрат для нитрифицирующих бактерий I: 310—312
- образование из аргинина III: 12
- определение II: 345—346, 353—356
- Аммиачный электрод II: 186—187
- сАМР, регуляция синтеза *lac*-оперона II: 418—421
- Анаэробиз I: 181—197
- восстанавливающие агенты I: 184—186
- измерение I: 181—182
- методы культивирования нестрогих анаэробов I: 185—187
- — — строгих анаэробов I: 187—192
- Анаэробные камеры I: 187, 192—195
- Анаэробы, массовое культивирование I: 386, 387, 395
- разложение мяса III: 31
- системы тестирования API 20A III: 51
- — — Minitек III: 51
- Анаэробостаты I: 187, 192—195
- Антибиотики, биоавтография I: 368
- ингибирование ими при получении культур I: 301—302
- приготовление градиентного агара II: 29
- устойчивость к ним мутантов II: 29
- Антигены, идентификация электронной микроскопией I: 125—126
- Антисывороточная агглютинация, получение культур I: 295
- Антроновый метод определения углеводов II: 293
- Апохроматический объектив I: 25
- Аппроксимация по способу наименьших квадратов I: 503—508
- α -Арабиноизомеразы, определение II: 402—403
- Аргинин в составе полужидкой среды III: 81
- — — проявляющего раствора III: 84
- количественное определение по росту культур I: 261—267
- тест на аммиак III: 12
- Аргининдезиминая III: 12—13
- Аргининовый бульон, состав III: 69
- Арилсульфатаза III: 14
- Ароматическое кольцо, разрыв III: 13
- Ауксанографический метод III: 58—59
- Ауксотрофные мутанты, изучение метаболических путей III: 429
- организмы I: 199
- Ауксотрофы, выявление мутаций II: 37—40
- Аффинная хроматография II: 216—221
- Ахроматический объектив I: 25
- Ацетатный буфер I: 170
- Ацетилен, метод определения нитрогеназной активности III: 59
- N-Ацетил- α -цистеин I: 339
- Аэрация жидкой культуры I: 389, 391
- Аэробное культивирование в колбах I: 383—386
- — — ферментерах I: 387
- Бактериальные аэрозоли, безопасность при работе с ними III: 210—217
- клетки как субстрат для миксококков I: 315—316
- Бактериальный паразитизм бледновибрионов I: 316—317
- Бактерии автотрофные I: 198
- ауксотрофные I: 199
- гетеротрофные I: 198
- паразитические I: 199
- сапрофитные I: 199
- транспорт растворенных веществ II: 440, 450—456
- Бактериофаг λ , трансдукция в *E. coli* II: 84—90
- P1, трансдукция в *E. coli* II: 91—100

- Баллистическое разрушение клеток I: 143—145
 Бархат, использование при перепечатывании бактерий II: 57—59
 Бацитрабиновый тест III: 14
 Бделловибрионы, выделение I: 316—317
 Белки, определение молекулярной массы гель-электрофорезом II: 270—274
 — — с помощью биуретовой реакции II: 359—360
 — — — Кумаси синего II: 360—361
 — — — реактива Фолина II: 356—358
 — — — спектрофотометра II: 361—362
 — потребность в них бактерий I: 207—208
 — разделение адсорбционной хроматографией II: 203—205
 — фракционирование и определение молекулярной массы II: 225
 Биоавтография I: 367—368
 Биологическая опасность, знак III: 194, 196
 Биологически безопасные боксы III: 210—217
 Биологические методы накопления чистой культуры I: 278
 Биомасса, измерение III: 233—238
 — — объема III: 236
 — — плотности III: 237
 — — содержания воды III: 235
 — — сухого веса III: 234
 — — сырого веса III: 233
 — расчеты выхода I: 432—438
 Биотин, потребность в нем бактерий I: 203
 Биофизические факторы роста бактерий I: 165—195
 — — — анаэробноз I: 181—195
 — — — активность воды и осмотическое давление I: 173—175
 — — — давление I: 178
 — — — кислород I: 178—181
 — — — pH I: 165—173
 — — — температура I: 175—178
 Биохимические факторы роста бактерий I: 198—276
 — — — количественное определение I: 260—268
 — — — потребности в питательных веществах I: 200—211
 — — — составление сред I: 212, 213—225, 226—259
 Биуретовая реакция II: 359—360
 Боксы биологически безопасные III: 210—217
 Бриллиантовая зелень I: 329
 Брожение, выявление мутаций II: 36—37
 Бромистый этидий, применение при центрифугировании II: 145—152
 5-Бромурацил как мутаген II: 16, 18—20
 Бромциан, активация сефарозы II: 218
 Бруцеллы, состав агара для них I: 330
 Бульон гидролизата казеина и соевой муки I: 343
 — E I: 332
 — L II: 55
 — MRVP III: 78
 — Oxoid II: 56
 — предварительно восстановленный с рубленным мясом III: 72—73
 — Penassay II: 58
 — с селенитом F I: 343
 — сульфаниламидный II: 56
 — *Тодда — Хьюитта*, модифицированный III: 81
 — *Хейнса*, состав III: 75
 Бульонная основа *Мёллера* III: 78
 Бумага, хранение на ней бактерий I: 516
 Бутылы для выращивания культур бактерий I: 387
 Буферы, значения pK_a соединений, входящих в их состав I: 168

- Буферы, используемые в бактериологических средах I: 167—170
 — приготовление I: 167—170
 — формулы I: 169
- Вакуумные системы, применение III: 207—209
- Веронал-ацетатный буфер, состав I: 129
- Вибрационные мельницы II: 383
- Вибрионы, получение культур I: 296
- Вид, определение III: 5
- Витамины B₆, потребность в нем бактерий I: 205
 — B₁₂, потребность в нем бактерий I: 206
 — K, потребность в нем бактерий I: 207
- Витамины, количественное определение по росту культур I: 267—268
 — потребность в них бактерий I: 202—207
- Влажные препараты живых клеток I: 56—57
- Вода, активность в среде при росте бактерий I: 173—175
 — измерение активности I: 173
- Водные бактерии I: 86—88
- Водород, определение газовой хроматографией III: 48
 — как субстрат для *Aquaspirillum* I: 308—309
 — электрод для измерения его ионов II: 182—185
- Восстанавливающие агенты, культивирование анаэробов I: 184—185
- Вращающиеся пробирки для культивирования строгих анаэробов I: 191—192
- Выделение бактерий, биологические методы I: 316
 — — биофизические методы I: 279—295
 — — биохимические методы I: 295—316
 — — обогащение мутантными клетками II: 26—28
 — — получение чистых культур I: 318—324
- — среды и реактивы I: 324—350
- Выживание бактерий при использовании различных методов хранения I: 531—532
- Высушивание из замороженного состояния I: 517—526
 — при хранении бактерий I: 516—517
- Газ, образование из сахароз III: 22—23
- Газовая хроматография кислот и спиртов III: 46—48
 — — определение нитрогеназной активности III: 63
- Газожидкостная распределительная хроматография II: 206—212
 — — — определение жирных кислот II: 321
 — — — стандартные растворы III: 91—92
- Галактоза, определение в бактериях II: 297
- β-Галактозидаза II: 400—401; III: 22
 — стандартизация определения у *E. coli* II: 392—393
- Галобактерии, получение культуры I: 200
- Галофилы, среда обитания I: 332—333
- Гауссово распределение I: 491
- Гексозамин, определение в бактериях II: 299—304
- Гель-фильтрация II: 221—233
- Гель-электрофорез II: 258—278
 — в полиакриламиде I: 156—159
 — изучение свойств плазмидной ДНК II: 139—145
 — фрагментов ДНК II: 142—145
- Гемолиз III: 24—25
- α-Гемолитические стрептококки, рутинный тест III: 15, 36—37
- β-Гемолитические стрептококки, бацитрациновый тест III: 14
- Генетика бактерий II: 5, 165
 — — мутации II: 8—64
 — — перенос генов II: 65—125
 — плазмид II: 128—165

- Генетическая характеристика бактерий III: 111—163
- Гены, конъюгация II: 101—117
- перенос II: 65—125
- Гептозы, определение в бактериях II: 307
- Гидроксилapatит, адсорбция на нем ДНК III: 118—122, 143—144
- Гидролазы, активность II: 400—401
- Гидролиз кислотой I: 51
- нуклеиновых кислот III: 35—36
- Гиперхромизм, определение ДНК и РНК III: 125
- Гипохлоритный реактив III: 92
- Гиппурат, гидролиз III: 25—26
- Гифомикробы, получение культуры I: 308
- Гликоген, выделение II: 298—299
- Глутаминсинтетаза, определение II: 403—405
- D-Глюкоза, определение в бактериях II: 296
- Глюкозо-триптоновый агар, состав I: 332
- Гомология нуклеиновых кислот III: 111, 129—161
- Грамотрицательные бактерии, выделение плазмидных ДНК II: 131—132
- — — получение I: 299
- — — разрушение для выделения нуклеиновых кислот III: 113—114
- — — среда для выращивания и условия культивирования I: 215—218
- Грамположительные бактерии, разрушение для выделения нуклеиновых кислот III: 114—115
- — — среда для выращивания и условия культивирования I: 218—219
- Гуанин и цитозин, определение молярных процентов в ДНК III: 127—129
- Давление, влияние на рост клеток I: 178
- осмотическое I: 173—175
- Двуокись углерода, измерение радиоактивности ^{14}C II: 249
- — — потребность в ней бактерий I: 198, 200
- Двухфазная массовая культура I: 364—366
- Дезинтеграция клеток II: 379—386
- Дезинфекция химическая III 217—230
- Деление клеток I: 65
- Деления II: 9, 11
- Дендрограммы III: 106—109
- Детектор пламенно-ионизационный II: 208
- по теплопроводности II: 208
- Детергенты ионные I: 153
- использование для фракционирования клеток I: 152—155
- неионные I: 153—154
- Диализ, периодическое и непрерывное культивирование I: 417—426
- Денитрификация III: 33—34
- Диски угольно-желатиновые III: 83
- Диск-электрофорез II: 258—275
- Дисперсионный анализ I: 495
- Дифениламин, определение концентрации ДНК III: 125—126
- — — реактивы и оборудование II: 335—337
- Дифференциальное центрифугирование I: 148—149
- ДНК см. Нуклеиновые кислоты
- выделение и количественное определение I: 67—69; III: 115—122
- — — из плазмид II: 130—139
- гомология III: 129—156
- — — определение мембранным методом III: 150—156
- — — методом реассоциации в растворе III: 139—150
- определение в бактериях II: 334—340
- — — концентрации с дифениламином III: 125—126
- — — молярных процентов гуанина и цитозина III: 127—129

- ДНК, получение меченых препаратов III: 133—139
 ДНК-аза, раствор для теста с метиловым зеленым III: 85
 ДНК-полимераза I III: 137
- Жгуттики, методы окраски I: 77—79
 — — — по Грэю I: 77—78
 — — — — Ляйфсону I: 79
 — — определения III: 20—21
 Желатина, гидролиз III: 23—24
 — использование при хранении бактерий I: 517
 Желатино-агаровая пластинка для световой микроскопии I: 47
 Железопорфирины, потребность в них бактерий I: 206—207
 Желчно-эскулиновый агар I: 328
 Желчь в составе агара III: 70
 — использование для фракционирования клеток I: 154, 300; III: 15
 Животные, инфицирование возбудителем чумы *Yersinia pestis* I: 318
 — — для получения культур *Streptococcus pneumoniae* I: 318
 — предотвращение заражения III: 205—207
 Живые культуры I: 46
 — — влажные препараты I: 56—58
 Жидкая культура бактерий I: 374—441
 — — — периодические системы I: 376—395
 — — — проточные системы I: 395—410
 — — — расчеты выхода биомассы I: 432—438
 — — — сбор и очистка I: 426—432
 — — — специальные системы I: 411—426
 Жидкостная хроматография под высоким давлением II: 213—216
 Жидкостно-жидкостная рас-
 предельительная хроматография II: 205—206
 Жидкостные сцинтилляционные счетчики II: 247—255
 Жирные кислоты, определение в бактериальных клетках II: 321—322
 — — потребность в них бактерий I: 209
 Жиры, окрашивание III: 86
- Закон Ламберта — Бэра II: 168, 171—172
 Замороженная система, рост бактерий I: 376
 Замораживание, хранение бактерий I: 515—516
 Замораживание — оттаивание клеток I: 148
 Заражение животных *Streptococcus pneumoniae* I: 318
 Зеркала с задней и передней отражающей поверхностью I: 26, 27
 Зональное центрифугирование I: 149
- Излучение, использование при стерилизации III: 182—185
 Измерение Eh I: 182
 — размера бактерий I: 63—64
 — роста бактерий I: 442—511
 — — — источники ошибок I: 446
 — — — наиболее вероятные числа I: 466—474
 — — — подсчет колоний I: 450—466
 — — — с помощью светорассеяния I: 474—475
 — — — статистика и расчеты I: 490—509
 Изомеразы, определение III: 402—403
 Изопропиловый спирт, использование при дезинфекции III: 218
 Изотопы, баланс углерода II: 430—437
 — использование при изучении ферментов II: 342—345
 Изoeлектрическое фокусирование II: 275—278

- Иммерсионные масла I: 31—33
 Иммерсионный объектив I: 18
 Имобилизованные клетки I: 425—426
 Иммуноэлектрофорез II: 275—278
 Индол, образование III: 27—28
 Индофеноловый синий, определение аммония II: 353—354
 Индукция и репрессия ферментативного синтеза II: 414—421
 Инокуляторы многоточечные III: 53—57
 Инокуляция множественная III: 57—58
 Интерференционные световые фильтры I: 26
 Иод, окрашивание липидов на хроматограммах II: 315
 Иодофоры, использование при дезинфекции III: 219—220
 Ионнообменная хроматография II: 191—201
 Ионселективные электроды II: 181—191
 Кадмий, восстановление нитрата II: 351—352
 Казеин, гидролиз III: 15—16
 Казеин-соевая мука, гидролизат для бульона I: 343
 — — — — агара III: 81
 Калий-фосфатный буфер III: 90—91
 Калькуляторы, использование для измерения экспоненциального роста I: 503—508
 Капсулы, метод окраски по Антони I: 77
 — — — — Гиссу I: 76
 — — — — Дюгиду I: 76
 Карболфуксинный I: 71
 Каррагенан как отвердитель бактериологических сред I: 359—360
 Каталаза III: 16
 Каулобактеры, получение I: 302—303
 2-Кетоглюконат, образование при окислении глюкозы III: 28
 2-Кето-3-дезоксиктановая кислота, определение в бактериях II: 305
 3-Кетолактоза, образование при окислении лактозы III: 29
 Кислород, аэрация жидкой культуры I: 178—180
 — определение полярографическим методом II: 187—191
 — растворенный I: 179
 — скорость поглощения I: 180
 Кислотоустойчивость бактерий при окрашивании I: 70—73, III: 10
 — — — — по Труанту I: 72
 — — — — Циллю — Нильсену I: 71
 Кислоты, образование из углеводов III: 11
 — определение газовой хроматографией III: 46—48
 Кишечная палочка (*E. coli*), биохимические факторы роста I: 199
 — — выделение плазмидной ДНК II: 130—132
 — — перенос плазмид II: 105—110
 — — подавление роста I: 299
 — — среда для выращивания и культивирование I: 216
 — — трансдукция II: 84—101; III: 37, 39, 43, 45, 46
 — — транспорт метаболитов II: 464
 — — трансформация II: 75—80
 — — фракционирование I: 159—161
 — — хромосомный перенос II: 110—117
 Клетки, измельченные в твердом состоянии I: 145
 Клеточные стенки II: 325—333
 — фракции I: 138—161
 Коагулаза III: 18
 Ковалентная модификация ферментов II: 406, 411—413
 Кодирование данных для нумерической таксономии III: 102—104
 Кокковидные тела III: 19
 Колиподобные бактерии I: 299
 Количественное определение

- аминокислот по росту культур I: 261—267
 — — веществ по росту культур I: 260—268
 — — витаминов по росту культур I: 267—268
 Колонии, подсчет I: 458—466
 — форма и вид III: 19
 Колориметры, определение мутности клеток I: 476—479
 — типа Klett-Summerson I: 487—488
 Компенсационные окуляры I: 25
 Компетентность клеток, определение III: 66
 Конденсатор I: 27
 Конъюгация II: 65, 101—117
 Коринебактерии, получение культуры I: 297
 Коэффициент *Бунзена* II: 190
 Коэффициент точности I: 497—498
 Красители для флуоресцентной окраски I: 72
 — стандартные окислительно-восстановительные потенциалы I: 183
 Краткий определитель бактерий *Берги* I: 11; III: 6, 9
 Крахмал, гидролиз III: 43
 Кривые плавления ДНК, определение молярных процентов гуанина и цитозина III: 127—129
 Криопротекторы для хранения бактерий I: 521—522, 527—528
 Кристаллический фиолетовый I: 61
 — — окраска по *Граму* I: 68
 — — — — в модификации *Берка* I: 69
 — — — — — *Хукера* I: 68
 Культивирование бактерий, применение ЭВМ I: 423—425
 — строгих анаэробов, метод *Хангейта* I: 187—192
 Культуральные пробирки I: 382—383
 Кумаси синий II: 360—361
 Лаг-фаза роста бактерий I: 376
 Лакмусовое молоко, приготовление III: 77
 Лактат как субстрат для пропионовых кислотных бактерий I: 310
 Лактатная среда I: 334
 Лактобациллы, получение культуры I: 297
 Лактозо-тетразолиевая среда II: 55
 Лецитиназа III: 29
 Лиазы II: 401—402
 Лигазы, определение II: 403—405
 Лизиндекарбоксилаза III: 30
 Лизис клеток I: 147; II: 380—381
 Лизостафин, выделение плазмидных ДНК II: 134—135
 Лизоцим, гидролиз бактериальных клеток I: 145—147; 380—381
 Линейный рост бактерий I: 381
 Лиофилизация при длительном хранении бактерий I: 517—526
 Липаза III: 29—30
 Липиды, идентификация жирных кислот II: 321—322
 — — фосфолипидов II: 317—320
 — классификация II: 308—313
 — окраска иодом II: 315—316
 — определение фосфата в фосфолипидах II: 316
 — фракционирование фосфолипидов II: 313—317
 — экстракция II: 309—311
 — — поли- β -гидроксипутирата II: 322—325
 Липовая кислота, потребность в ней бактерий I: 206
 Липополисахариды, выделение и характеристика II: 331—332
 Листерии, бульон для их выращивания I: 334
 Логарифмический рост бактерий I: 375
 Локальный мутагенез, LC-агар II: 59

Люминесцентная микроскопия
I: 29—31

Малонат III: 30

Малонатный бульон III: 77

Манометрия II: 278—279

Математическое моделирование
при культивировании бакте-
рий I: 423

Мембранные везикулы II:
464—466

— фильтры, подсчет колоний
I: 458

Метаболизм бактерий II: 166

— — изучение ферментатив-
ной активности II: 374—439

— — — физическими метода-
ми II: 167—282

Метаболиты, определение с по-
мощью газовой хроматогра-
фии III: 46—48

Метан, определение с помощью
газовой хроматографии III: 48

Метанообразующие бактерии
I: 218

Метанол как субстрат для
гифомикробов I: 308

Метиленовый синий I: 61—62

Метиловый зеленый, тест на
ДНКазу III: 85

— красный III: 31

Метод висячей капли при мик-
роскопировании I: 46, 58

— *Мармура*, выделение ДНК
III: 115—118

— окрашивания по *Гименецу*
I: 86

— — — *Гимзе* I: 85

— определения белков по *Лоу-*
ри II: 356—358

— отпечатков II: 37—40

Методы идентификации бакте-
рий в световой микроскопии
I: 54—88

— микробиологии I: 12

— негативного окрашивания I:
59

— общей бактериологии I: 11

— подсчета бактериальных кле-
ток I: 450—457

Микоплазмы I: 84

— получение I: 298, 299, 301

— условия культивирования I:
222

Микроаэрофилы, выращивание
I: 369—370

Микрометр I: 64

Микроскопия с высоким раз-
решением I: 24—29

Микроцисты III: 19, 20

Миксококки, получение нако-
пительных культур I: 315—
316

Минеральное масло I: 514

Минимальный бульон II: 58

Миссенс-мутации II: 11

Мицелиальный тип роста I:
447—448

Многоточечные инокуляторы
III: 53—57

Множественная инокуляция
III: 57—58

Молоко, тест на него III: 31—
32

Молочная кислота, оптическое
вращение III: 48—50

— — реактив для определения
III: 85

Монтирование микроскопиче-
ских препаратов III: 83

Морская вода, выявление бак-
терий I: 86—88

— — искусственная III: 80

— — концентрирование мик-
роорганизмов I: 86—87

Морфология бактерий I: 11—
161

— — изучение с помощью
электронной микроскопии I:
90—137

— — приготовление препара-
тов II: 45—52

Мочевина в составе агара
Кристенсена III: 74

Мурамидазы, разрушение с их
помощью клеток I: 145—147

Мурамовая кислота, определе-
ние в бактериях II: 304—
305

Мутагенность канцерогенов II:
48—55

Мутагены II: 16—17

Мутации II: 8—64

— выбор мутагена II: 12—25

— — мутанта II: 9

— выявление II: 28—40

— изучение свойств мутантов
II: 41—43

- Мутации, использование II: 43—55
 — локальные II: 44—48
 — со сдвигом рамки II: 10, 11
 Мясо, разложение анаэробами III: 31
- Нагревание, получение культур I: 281—284
- Наиболее вероятные числа I: 466—474
- На-ацетатный буфер II: 56
- На-додецилсульфат, выделение плазмидных ДНК II: 132—134
- Негативное окрашивание I: 95—108, 128
 — — для световой микроскопии I: 59
- Нейтральные светофильтры I: 26
- Неорганические ионы, потребность в них бактерий I: 200—201
- Несбалансированный рост бактерий I: 374, 445
- Нефелометрия, измерение концентрации бактерий I: 488—490
- Никотиновая кислота, потребность в ней бактерий I: 203
- Нильский голубой серноокислый III: 86—87
- Нитрат, анализ азота II: 342—344, 350—353
- Нитратредуктаза, активность II: 395—396
 — восстановление нитрата и денитрификация III: 33—34
 — индукция II: 415—416
- Нитрит, анализ азота II: 341, 342, 349—350
- Нитриты, реактивы для теста на их присутствие III: 87—88
- Нитрификаторы I: 340
- Нитрифицирующие бактерии, получение I: 310—312
- Нитрогеназная активность III: 59
- Нитрозогуанидин II: 15, 17, 18
- Ножи для приготовления срезов I: 113
- Нонсенс-мутации II: 10, 11
- Нуклеаза S1, изучение гомологии ДНК III: 139—142, 144—145
- Нуклеиновые кислоты. См. также ДНК, РНК
 — — выделение III: 115—124
 — — гидролиз III: 35—36
 — — ионообменная хроматография II: 197—198
 — — молекулярная масса II: 274—275
 — — определение и идентификация в бактериях II: 334—340
 — — — концентрации и степени чистоты III: 124—126
 — — электронная микроскопия I: 120
- Нумерическая таксономия III: 98—110
 — — выбор тестов III: 100—102
 — — дендрограммы III: 106—109
 — — кодирование данных III: 102—104
 — — обработка данных на ЭВМ III: 104—106
 — — отбор штаммов III: 99—100
- Обогащение мутантными клетками II: 26—28
- Обратные мутации, анализ II: 31—35
- Объективы для световой микроскопии I: 18, 25
- Окислительно-восстановительный потенциал I: 181—183
- Окись алюминия, использование при растирании клеток II: 384
- Окраска по Гименецу I: 86
 — — Гизме I: 85
 — — Граму I: 67—70
- Окрашивание бактериальных цист I: 75—76
 — гелей II: 268—270
 — для электронной микроскопии I: 100—119, 128—129
 — жгутиков I: 77—79
 — капсул и слоев слизи I: 76—77
 — микоплазм I: 84

Окрашивание на кислотоустойчивость бактерий I: 70—73;
III: 10
— негативное I: 59, 95—108, 128
— простое I: 59—62
— реактивом *Шиффа* I: 81—82
— риккетсий I: 84—62
— спирохет I: 83
— цитоплазматических включений I: 79—82
— эндоспор I: 73—75
Оксидазный тест II: 298; III: 37
Оксидоредуктазы II: 395—397
las-Оперон, регуляция синтеза II: 417—421
Оптическая плотность I: 478
Оптическое вращение, определение III: 48—50, 85
Оптохин III: 36
Орнитиндекарбоксилаза III: 37
Орнитин — карбамоилтрансфераза II: 398—399
Орциновая реакция, определение РНК II: 337; III: 126
— — реактивы и оборудования II: 338—339
Освещение по *Кёлеру* I: 27—28
— при микроскопии I: 26
— — получении культур I: 289—294
Осмиевая фиксация I: 110
Осми́й-глутаральдегидная фиксация I: 108—110
Осмотически чувствительные клетки II: 459—463
Осмотическое давление при росте клеток I: 173—175
Основная среда *Гизбергера* I: 332
— — для получения накопительных культур *Rhodospirillaceae* I: 325—326
— — — *Thermus* I: 327
— — — целлюлотических цитофаг I: 327
— — полная I: 262—265
Основные неорганические среды А и В I: 326, 327
Открытая система, рост бактерий I: 395
Оттенивание металлами I: 117—119

Ошибки при количественном измерении роста бактерий I: 496—497
O/129-тест III: 36
O/F-тест III: 37, 38, 75—76

Палочки и кокки, образующие споры I: 219
Пантомоновая кислота, использование ее бактериями I: 203—204
Паразитизм бактериальный бделловибрионов I: 316—317
Паразитические формы бактерий I: 199
Пелоскоп, взятие проб почвы I: 88
Пенициллин I: 301
— выделение плазмидных ДНК II: 135—136
— использование его для обогащения мутантными клетками II: 27
Пениогашение при культивировании в жидкой среде I: 392—393
Пептидогликаны, выделение II: 329—331
Пептиды, потребность в них бактерий I: 207—208
Периодическая культура с добавлением субстрата I: 412—413
Периодические системы для жидких культур I: 376—395, 411—426
Переокиси, использование их при дезинфекции III: 220
Перемешивание жидкой культуры I: 389, 391
Пиоцианин III: 42
Пиримидины, потребность в них бактерий I: 208
Питательные вещества, потребность в них бактерий I: 200—211
Питательный бульон и агар II: 57—58; III: 78
Плазмидные ДНК II: 128—165
— — выделение II: 130—139,
— — выявление гомологии II: 152—164

- Плазмидные ДНК, центрифугирование в градиенте плотности II: 145—152
 — — электрофорез в геле II: 139—145
 Плазмиды конъюгативные II: 105—110
 Пластинки для световой микроскопии I: 46—47, 58—62
 Платиновый электрод II: 187—188
 Плотность сухого и сырого вещества III: 237
 Подавление активности ферментов II: 386—388
 Подвижность бактерий I: 66—67; III: 32
 — — определение в полужидких средах I: 370
 — клеток I: 284—287
 Поддерживающая среда I: 513
 Подсчет клеток в микроскопе I: 450—454
 Поли-β-гидроксипутират, гидролиз III: 41
 — суспензия гранул III: 89—90
 — тест на его присутствие III: 40—41
 — экстракция из бактериальных клеток II: 322—325
 Полимеры клеточной стенки II: 325—333
 Полисахариды, окрашивание I: 81—82
 Полифосфаты, окрашивание I: 80—81
 Полужидкая аргининовая среда III: 81
 — безазотная среда с малатом III: 69
 Полужидкие среды, методы выращивания бактерий I: 368
 Получение накопительных и чистых культур I: 277—355
 — — — среды и реактивы I: 324—350
 — чистых бактериальных культур I: 318—324
 Посев в агар для подсчета колоний I: 458
 — — многослойный агар I: 458, 464—466
 — — тонком слое I: 458
 — на поверхность агара I: 458, 460—464
 Постоянные препараты I: 62
 Почвенная среда *Прингсхейма* I: 342
 Почвенные бактерии, методы микроскопического изучения I: 88
 Почкующиеся и стебельковые бактерии, условия культивирования I: 214
 Предварительно восстановленная среда I: 189—190
 — — — молочная III: 77
 — восстановленный агар РУ и бульон РУ III: 79—80
 Препараты для световой микроскопии I: 45—52, 56—63
 — — электронной микроскопии I: 100—119
 Пресс *Френча*, разрушение клеток II: 382—383
 — *Хьюза* II: 385
 Преципитиновый тест, идентификация стрептококков III: 65—66
 Проба *Моллиша* на углеводы II: 293
 Проницаемость бактериальных клеток II: 440—450
 — — — выражение результатов II: 448—449
 — — — методика измерения II: 441—446
 — — — определение II: 440
 — — — — межклеточного пространства II: 447—448
 — клеток для исследования ферментов II: 378—379
 Пропионовокислые бактерии, селекция I: 310
 Просвечивающая электронная микроскопия I: 94, 95—120
 — — — негативное контрастирование I: 95—108
 — — — нуклеиновых кислот I: 120
 — — — оттенение металлами I: 117—139
 — — — приготовление срезов I: 108—116
 Протондвижущая сила, определение II: 456—459

- Проточные системы I: 395—410
- Проявляющий раствор для аргинина III: 84
- Псевдомонады, получение культуры I: 306—307, 312
- флуоресцирующие III: 21
- Психрофильные и психротрофные культуры, получение I: 279
- Пуассоновское распределение I: 492—495
- Пурины, потребность в них бактерий I: 208
- Пути метаболизма II: 421—437
- — баланс изотопного углерода II: 430—437
- — использование радиоизотопов для их анализа II: 425—429
- — ключевые ферменты II: 436—437
- — общие методы исследования II: 422—429
- pH, влияние на рост бактерий I: 167—172
- измерение I: 165—167
- постоянный контроль I: 172
- pH-индикаторы I: 166; III: 88—89
- pH-метр, калибровка II: 183
- Равновесное состояние I: 395
- центрифугирование в градиенте плотности I: 149—150
- Радиоавтография I: 127
- Радиоактивность, безопасность при работе с ней II: 234—236
- измерение II: 233—258
- — в жидкостных сцинтилляционных счетчиках II: 247—255
- определение химических компонентов бактериальной клетки II: 283—290
- статистика счета II: 256—258
- Радиоактивные изотопы, физические свойства II: 233
- — использование при изучении путей метаболизма II: 425—429
- — определение количества II: 239—242
- Разрешение микроскопа I: 24
- Разрушение клеток I: 138—148
- — баллистическое I: 143—145
- — в твердом виде I: 145
- — выбор метода I: 138—139
- — для выделения нуклеиновых кислот III: 112—115
- — контроль за ним I: 139
- — мурамидазами I: 145—147
- — осмотическим лизированием I: 147
- — продавливанием через пресс I: 140—142
- — с помощью замораживания — оттаивания I: 148
- — ультразвуком I: 142—143
- Раствор глицерина для монтирования микроскопических препаратов III: 83
- Мора I: 57
- Растворы для разведения III: 231
- Расчеты при измерении скорости роста бактерий I: 490—509
- Реактив Бенедикта III: 83
- Ковача III: 85
- Моргана — Элсона для определения гексозаминов II: 300
- Несслера II: 355—356; III: 86
- ОНФГ III: 88
- Уильямсона и Уилкинсона III: 92
- Фолина для определения белка II: 356—358
- Шиффа I: 81—82
- Эрлиха III: 84
- Реактивы для сред III: 83—92
- — — используемых при получении накопительных и чистых культур I: 324—350
- Реакция Квеллунга III: 66
- Фогес-Проскауера III: 45
- Регуляция активности ферментов II: 406—413
- синтеза II: 413—421

- Редокс-потенциал I: 181—182
 Репликаторы бархатные II: 59;
 III: 57—58
 Репрессия ферментативного
 синтеза II: 414, 416, 417—421
 Рестриктаза II: 142—145
 Рибофлавин, потребность в нем
 бактерий I: 204—205
 Ризобии, получение I: 317
 Риккетсии, методы окраски I:
 85—85
 — среда для выращивания и
 условия культивирования I:
 221
 РНК. См. также Нуклеиновые
 кислоты
 — выделение III: 122—124
 — гомология III: 156—161
 — определение в бактериях II:
 337—340
 — с орцином III: 126
 — приготовление меченых пре-
 паратов III: 157
 — фракционирование III: 157—
 158
 Роение клеток I: 284
 Рост бактерий I: 163
 — — биологические факторы
 I: 165—195
 — — биохимические факторы I:
 198—276
 — — в жидкой культуре I:
 374—441
 — — измерение I: 442—511
 — — кривые роста I: 376—
 382
 — — на твердой культуре I:
 356—373
 — — несбалансированный I:
 445—446
 — — получение накопительных
 и чистых культур I: 277—355
 — — сбалансированный I:
 443—444
 Руководство по клинической
 иммунологии I: 12
 — — микробиологии I: 12
 Рэтен-фильтры I: 26
 Сальмонеллы и шигеллы I: 343
 — получение культуры I: 298
 Сахарозный градиент I: 150—
 152
 Сбалансированный рост бакте-
 рий I: 374, 443
 Сбор клеток при выращивании
 в жидкой культуре I: 426—
 432
 Световая микроскопия I: 16—
 43
 — — измерение размеров бак-
 терий I: 63—64
 — — иммерсионные масла I:
 31—33
 — — люминесцентная I: 29—
 31
 — — оборудование I: 16—17
 — — операции при работе с
 микроскопом I: 19—22
 — — оптимальные условия ра-
 боты I: 36, 40
 — — подсчет бактериальных
 клеток I: 450—454
 — — приготовление препара-
 тов I: 45—52
 — — причины и способы уст-
 ранения неисправностей I:
 36, 37—40
 — — с высоким разрешением
 I: 24—29
 — — уход за микроскопом I:
 33—36
 — — фазово-контрастная I:
 22—23
 — — фотографирование пре-
 паратов I: 41—43
 Светорассеяние, измерение рос-
 та клеток I: 474—475
 Светофильтры возбуждающие
 I: 30
 — задерживающие I: 30
 — запирающие I: 29
 Селенит, использование для
 получения культур сальмо-
 nell I: 298
 Сера как субстрат для *Desulfu-
 romonas acetoxidans* I: 314
 Сероводород, образование III:
 26—27
 Серология III: 64—68
 Сероукисляющие бактерии, сре-
 да Пфеннига и Библа I: 341
 Сефароза, активированная
 бромцианом II: 218
 Сидерохромы I: 207

- Силикагель как отвердитель бактериологических сред I: 360—361
 Симбиоз растений с ризобиями I: 317
 Синхронизированный рост бактерий I: 380
 Синхронная периодическая культура I: 413—417
 Система комбинированного тестирования API III: 51
 — — — Corning III: 52
 — — — Enterо-Set 20 III: 51
 — — — Enterotube III: 52
 — — — Micro-ID III: 53
 — — — Minitек III: 51
 — — — Oxi/Ferm III: 52
 — — — Patho Tec Rapid I-D III: 52
 Систематика в бактериологии III: 5—163
 — — — нумерическая таксономия III: 98—110
 — — — рутинные тесты III: 10—46
 — — — специальные тесты III: 46—68
 Сканирующая электронная микроскопия I: 94—95, 120
 Скольжение бактерий I: 66—67
 Скользящие бактерии, условия культивирования I: 213
 Слизь, метод окраски I: 76
 Смесь S-9, тест Эймса II: 50—51
 Соединения группы ICR II: 21, 22
 Соли, ингибирование ими при получении культур I: 300
 Спектрофотометры II: 168—176
 — для измерения мутности клеток I: 476—488
 Спириллы водные, получение культуры I: 303—305
 Спирохеты, метод окрашивания I: 83—84
 — среда для выращивания и условия культивирования I: 214
 Спирты, определение газовой хроматографией III: 46—48
 Споробразующие бактерии, получение культур I: 281—282
 Среда бактериологическая, безазотная III: 69
 — — — Иоча и Пенгры III: 82
 — — — Хино и Уилсона III: 75
 — — Бёрка модифицированная III: 72
 — — Борда и Холдинга III: 7, 71—72
 — — буферы для ее приготовления I: 167—172
 — — Велдкампa I: 347—348
 — — Виддла и Пфеннига I: 349
 — — Вили и Стокса I: 350
 — — Вольфа модифицированная I: 338—339
 — — для мутагенеза II: 55—60
 — — — нитрификаторов I: 340
 — — — переноса генов II: 117—125
 — — — получения накопительных и чистых культур I: 324—350
 — — Иверсона I: 334
 — — комплексная I: 210, 226—237, 250
 — — Левенштейна — Ионсена I: 334
 — — Мак-Брайда для листерий I: 336
 — — минеральная по Хатне-ру III: 76
 — — MOF III: 76—77
 — — M56 минимальная II: 57
 — — M56/2 II: 57
 — — поддерживающая I: 513
 — — полужидкая аргининовая III: 81
 — — полусинтетическая I: 210, 226—229, 232—235, 251—260
 — — предварительно восстановленная I: 189—190
 — — почвенная Прингсхейма I: 342
 — — рН-индикаторы III: 88—89
 — — разбавленная I: 302—306
 — — Рогозы I: 337—338
 — — — модифицированная I: 337

- Среда бактериологическая синтетическая I: 210, 260
 — — *Спарра* I: 129—130
 — — — использование при электронной микроскопии I: 110—111
 — — с отвердителями I: 356—361
 — — — сукцинатом и солями I: 344
 — — — триптофаном I: 347
 — — *Хью и Лейфсона* для теста O/F III: 75—76
 — — ASN-III I: 325
 — — BG-11 I: 327—328
 — — CHSS I: 330
 — — MN I: 337
 — — Nfb I: 340
 — — RGCA-SC I: 342
 — — YP I: 350
 Срезы клеток для электронной микроскопии I: 108—116, 128
 Стандартные буферы, pH II: 183
 — методы I: 344
 — ошибки I: 496—497
 Статистика при измерении роста бактерий I: 490—509
 Стафилококки, получение I: 300
 Стационарная фаза роста бактерий I: 376
 Стерилизация, биологические индикаторы III: 169—172
 — газом III: 175—182
 — облучением III: 182—185
 — паром III: 172—174
 — сред при выращивании клеток в жидкой культуре I: 407—408
 — сухим жаром III: 174—175
 — фильтрованием III: 185—186
 — эффективность III: 166—169
 Стерильные соединения сосудов I: 406—407
 Стрептококки α -гемолитические III: 15, 36—37
 — β -гемолитические, бацитрациновый тест III: 14
 — получение культур I: 299
 — преципитиновый тест III: 65—66
 Субкультивирование при не-
 продолжительном хранении бактерий I: 513
 Сукцинатдегидрогеназа II: 396—397
 Сульфатредуцирующие бактерии I: 313
 Счетная камера I: 451—453
 Счетчик клеток типа Coulter Counter I: 454—456
 Таксономия нумерическая. См. Нумерическая таксономия
 Таллий, использование при получении культур микоплазм и энтерококков I: 298
 Твердая культура I: 356—373
 — — двухфазная I: 364—366
 — — использование отвердителей I: 356—361
 Теллурит, использование при получении культур коринебактерий и стрептококков I: 297
 Температура, влияние на рост бактерий I: 175—178
 — высокая для получения культур I: 280—281
 — контроль во время инкубации I: 177
 — регулирование в ферментерах I: 391
 Тепловая фиксация I: 60
 Термостаты I: 176
 Термофилы, получение культур I: 280
 Тест на образование кислоты из углеводов III: 11
 — *Эймса* II: 48—55, 60
 t-Тест *Стьюдента* I: 495
 Техника безопасности, боксы III: 211—217
 — — в лаборатории III: 164—230
 — — дезинфекция III: 191—197, 217—230
 — — специальная III: 197—210
 — — стерилизация III: 166—190
 — — физические меры III: 210—217
 Тиамин, потребность в нем бактерий I: 205

- Тиоктовая кислота. См. Липое-
 вая кислота
 Типовой штамм III: 5
 ТМ-буфер II: 56
 Толуол как субстрат для окис-
 ляющих его бактерий I:
 315
 Точковые мутации II: 9, 11
 Транзиция II: 12
 Трансверсия II: 12
 Трансдукция II: 46—48, 65,
 80—101
 Трансдуцирующий бактерио-
 фаг, приготовление II: 44—
 46
 Транспорт растворенных ве-
 ществ II: 440, 450—456
 Транспортные системы II: 440—
 441, 450—456, 463—466
 Трансфекция II: 66
 Трансферазы II: 397—399
 Трансформация II: 65—80
 Треониндегидрогеназа II:
 401—402, 421
 Трепонема, подвижность I:
 284—285
 — получение I: 284—285,
 287—288
 — Рейтера, условия культиви-
 рования I: 214
 Триптические пептиды, разде-
 ление II: 215—216
 Триптофан как субстрат для
 псевдомонад I: 306
 Трис-маленновый буфер II: 56
 Трис-HCl-буфер I: 170
 Тритиевая метка, трудности
 при работе с ней II: 245—
 246
 Тритон X-100, выделение плаз-
 мидной ДНК II: 130—132
 Турбидиметрия, измерение рос-
 та бактерий I: 475—488
 Турбидостат, культивирование
 клеток I: 409—411
 — сравнение с хемостатом I:
 399
 Тяжелые металлы, использова-
 ние их при дезинфекции III:
 220
 Уравнение Вант-Гоффа — Бой-
 ля II: 460
 — Гендерсона — Хассельбаха
 I: 171; II: 458
 — Нернста II: 181
 Углеводы, определение общего
 количества II: 292—307
 — содержание в бактериях II:
 211
 — — — галактозы II: 297
 — — — — гексозаминов II
 299—304
 — — — — гептозы II: 307
 — — — — гликогена II: 298—
 299
 — — — — D-глюкозы II: 296
 — — — — 2-кето-3-дезоксик-
 тановой кислоты II: 305—306
 — — — — мурамовой кисло-
 ты II: 304
 — тест на образование кислот
 III: 11
 Угольно-желатиновые диски
 III: 83
 Ультразамораживание при хра-
 нении бактерий I: 526—530
 Ультразвук, использование его
 для разрушения клеток I:
 142—143; II: 383—384
 Ультразвуковая обработка при
 получении культур I: 294—
 295
 Ультрафиолетовое облучение
 при получении культур I:
 294
 Ультрафиолетовый свет, ис-
 пользование его при спектро-
 фотометрическом определе-
 нии белка II: 361—362
 — — получение мутантов II:
 13—15
 Управляемая периодическая
 культура I: 411—412
 Уранилацетат I: 114
 Уреаза III: 44
 Условно летальные мутанты
 II: 10
 УФ-спектрофотометрия, опре-
 деление концентрации нук-
 леиновых кислот III: 124—
 125
 Фаза отмирания роста бак-
 терий I: 376
 Фазово-контрастная микроско-
 пия I: 22—24

- V-фактор III: 45
 X-фактор III: 45
 Феназиновые пигменты III: 42
 Феиаланиндезаминаза III: 39
 Феиаланиновый агар III: 79
 Фенилэтанол, использование для получения культур стрептококков и стафилококков I: 299
 Фенол, использование при определении углеводов II: 295
 Hfr-фенотип II: 111—113
 Ферментативная активность II: 374—439
 — — — измерение II: 386—405
 — — — регуляция II: 406—421
 Ферментеры I: 387—395
 Ферменты, гидролиз бактериальных клеток I: 145—147
 — исследование с помощью изотопов II: 342
 — локализация электронной микроскопией I: 124, 126
 Физические методы в бактериологии II: 167—282
 — — — гель-электрофорез II: 258—278
 — — — и их использование при накоплении чистой культуры I: 227
 — — — — измерения с помощью ионселективных электродов II: 181—191
 — — — — — радиоактивности II: 233—258
 — — — — манометрия II: 278—279
 — — — — фотометрия II: 167—181
 Фиксатор *Шаудина* I: 61
 Фиксация бактерий для электронной микроскопии I: 104—106, 108—110, 128
 — парами I: 50—52
 — препаратов I: 47—52
 Фиксированные препараты для световой микроскопии I: 47—52, 60
 — — — — — получение методом негативного окрашивания I: 59
 — — — — — простого окрашивания I: 59—62
 — — по *Боуэну* I: 47—50
 Фильтрация воздуха для стерилизации I: 391—392
 — для выявления бактерий в воде I: 86—88
 — — стерилизации III: 185—186
 — мембранная I: 427—428
 — осадочная I: 427—428
 Фильтровальная бумага, использование при хранении бактерий I: 516
 Фильтруемость культур I: 287—289
 Фирмы — изготовители оборудования для электронной микроскопии I: 131
 — — — выращивания клеток в жидкой культуре I: 438
 — — — стерилизации III: 170, 187
 — приборов и оборудования для ферментеров I: 390
 — сред и реактивов II: 61—62
 Флуоресцирующие антитела III: 67—68
 Флуоресцирующий пигмент III: 21
 Флуориметрия II: 179—181
 Фолиевая кислота I: 202
 Форма бактерий I: 65
 Формальдегид, использование его для дезинфекции III: 218
 — — — стерилизации III: 180—182
 — обработка культур I: 302
 Формиат — фумарат III: 21—22, 84
 Фосфат, определение в фосфолипидах II: 316—317
 Фосфатно-солевой буфер III: 90
 Фосфатный буфер I: 170
 Фосфолипиды, идентификация II: 317—321
 — определение фосфата II: 316—317
 — фракционирование II: 316
 Фосфофруктокиназа, определение II: 397—398
 Фотографирование препаратов I: 41—43
 Фотография в электронной микроскопии I: 121—123
 Фотокамера I: 41

- Фотометрические методы в бактериологии II: 167—181
- Фракционирование клеточных фракций I: 148—161
- — — примененные детергентов I: 152—155
- — — центрифугированием I: 148—150
- — — — в градиенте сахарозы I: 150—152
- — — электрофорезом в полиакриламидном геле I: 156—158
- компонентов бактериальной клетки II: 283—290
- Характеристика бактерий III: 8—163
- — генетическая III: 111—163
- — общая III: 8—10
- — рутинные тесты III: 10—46
- — специальные тесты III: 46—68
- Хемостат, культивирование бактерий I: 308—409
- Хемотаксис, изучение на полужидких средах I: 370
- Химическая дезинфекция III: 217—230
- фиксация I: 47—50, 60—61
- Химические методы накопления чистых культур I: 278
- Химический состав бактериальной клетки II: 283—373
- — — азотсодержащие соединения II: 340—366
- — — белки II: 290, 356—362
- — — липиды II: 287—288, 308—325
- — — нуклеиновые кислоты II: 288—290
- — — органические кислоты и спирты II: 366
- — — полимеры стенки II: 325—333
- — — углеводы II: 292—308
- Хламидобактерии, условия культивирования I: 213
- Хлор, использование его при дезинфекции III: 219
- Холин, использование его бактериями I: 207
- Хранение бактериальных культур I: 512—534
- — — длительное I: 517—533
- — — непродолжительное I: 513—517
- Хроматография II: 191—233
- адсорбционная II: 202—205
- аффинная II: 216—221
- газожидкостная II: 206
- жидкостная под высоким давлением II: 213—216
- жидкостно-жидкостная II: 205—206
- ионообменная II: 191—201
- тонкослойная II: 313—316
- Хромосомный перенос II: 110—117
- Целлюлоза как субстрат для цитофаг I: 309
- Целлюлолитическая активность III: 17
- Центрифугирование II: 203—205
- в градиенте плотности плазмидных ДНК II: 145—152
- при фракционировании клеток I: 148—150
- сбор бактериальных клеток I: 429
- Цианобактерии I: 289, 294
- Циклосерин, использование его для обогащения мутантными клетками II: 28
- Цикл трикарбоновых кислот II: 198
- Цинк, использование его в методике восстановления нитрата II: 350—351
- Цисты, метод определения I: 75—76; III: 19—20
- Цитоплазматические включения, методы выявления I: 79—82
- Цитофаги, получение I: 286, 309
- Цитрат свинца I: 115—116
- в агаре *Кристенсена* III: 37
- — — *Симмонса* III: 81
- Цитрат-фосфатный буфер I: 170

- Чашки для подсчета колоний I:**
458, 460—466
- Четвертичные аммониевые ос-
нования, использование их
при дезинфекции III:** 219
- Числовая апертура I:** 24
- Чистые культуры, их получе-
ние I:** 318—324
- Четырехокись осмия, использо-
вание ее для фиксации кле-
ток I:** 50, 60—61
- Шприцы и иглы, применение
в бактериологических экспе-
риментах III:** 199—200
- Щелочные условия инкубации
при получении культур I:**
295—297
- ЭВМ-обработка данных нуме-
рической таксономии III:**
104—106
- Экспоненциальная фаза роста
бактерий I:** 376
- Экспоненциальный рост бакте-
рий, расчеты I:** 499—500
- Электроды аммиачные II:** 186—
187
- измерение активности ионов
II: 181—191
- *Кларка* II: 188
- **платиновые** II: 187—188
- Электронная микроскопия I:**
90—137
- значение и ограничения
I: 92—93
- — идентификация антиге-
нов I: 125
- — интерпретация результа-
тов I: 123—124
- — общие процедуры I: 90—
95
- — определение гомологии
цепей ДНК II: 156—164
- — радиоавтография I: 127
- — сканирующая I: 92—94,
120
- — трансмиссионная I: 94,
95—120
- — фирмы — изготовители
микроскопов I: 131
- — фотографирование пре-
паратов I: 121—123
- Электронный подсчет бактери-
альных клеток I:** 454—457
- Электрофорез см. также Гель-
электрофорез**
- в полиакриламидном геле I:
156—159; II: 258—275
- — — — измерение радио-
активности II: 249
- Элементы, содержание в бак-
териальных клетках II:** 367—
368
- Эндонуклеазы II:** 142—145,
152—156
- Эндоспоры, окрашивание I:**
73—75
- — по методу *Дорнера* I: 74
- — — — *Шефера-Фултона*
I: 75
- Эитеробактерии, получение I:**
300—301
- фракционирование I: 159—
161
- Эитерококки, получение куль-
туры I:** 298, 300—301
- Эскулин, гидролиз III:** 12
- Этилметансульфонат как мута-
ген II:** 23
- Этиловый спирт, использование
его при дезинфекции III:**
218

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть V

СИСТЕМАТИКА

Введение. <i>Н. Криг</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	5
Глава 20. Общая характеристика. <i>Р. Смайберт, Н. Криг</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	8
20.1. Рутинные тесты (10). 20.2. Специальные тесты (46). 20.3. Среды и реактивы (69). 20.4. Реактивы (83). 20.5. Литература (92).	
Глава 21. Нумерическая таксономия. <i>Р. Колуэлл, Б. Остин</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	98
21.1. Отбор штаммов (99). 21.2. Выбор тестов (100). 21.3. Кодирование данных (102). 21.4. Обработка данных на ЭВМ (104). 21.5. Представление результатов и их интерпретация (106). 21.6. Литература (109).	
Глава 22. Генетическая характеристика. <i>Дж. Джонсон</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	111
22.1. Разрушение клеток для выделения нуклеиновых кислот (112). 22.2. Выделение ДНК (115). 22.3. Выделение РНК (122). 22.4. Концентрация и степень чистоты нуклеиновых кислот (124). 22.5. Состав оснований ДНК (127). 22.6. Гомология ДНК (129). 22.7. Гомология РНК (156). 22.8. Литература (161).	

Часть VI

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Введение. <i>Г. Филлипс</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	164
Глава 23. Стерилизация. <i>М. Коржинский</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	166
23.1. Стерилизация паром (172). 23.2. Стерилизация сухим жаром (174). 23.3. Газы (175). 23.4. Излучение (182). 23.5. Фильтрация (185). 23.6. Фирмы-изготовители (187). 23.7. Литература (187).	
Глава 24. Предотвращение заражения и дезинфекция. <i>У. Баркли</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	191

24.1. Общие сведения (191). 24.2. Специальные лабораторные процедуры (197). 24.3. Физические меры по предотвращению заражения (210). 24.4. Химическая дезинфекция (217). 24.5. Литература (229).

Часть VII ПРИЛОЖЕНИЕ

Глава 25. Растворы для разведения и измерение биомассы. <i>Ф. Герхардт</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	231
25.1. Растворы для разведения (231). 25.2. Измерение биомассы (233). 25.3. Литература (238).	
Указатель латинских названий	239
Предметный указатель	243

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Том 3

Научный редактор Т. И. Пономарева. Мл. научн. редактор Р. Ф. Куликова. Художник А. В. Шипов. Технический редактор Т. Д. Панасюк. Корректор И. И. Дериколенко

ИБ № 3313

Сдано в набор 12.01.84. Подписано к печати 18.06.84. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага типографская № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 4,13 бум. л. Усл. печ. л. 13,86. Усл. кр.-отт. 13,86. Уч.-изд. л. 14,16. Изд. № 4/2553. Тираж 11 300 экз. Зак. № 1944. Цена 1 р. 30 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». 129820, Москва, ГСП, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.