

Выведение штаммов анаэробных бацилл (*Bacillus subtilis*)

способных перерабатывать углеводороды

Тип работы: Принципы и устройства очистки планеты Земля от промышленных, радиоактивных, сельскохозяйственных, биологических и других загрязнений

Актуальность. Одной из актуальнейших экологических задач в мире является борьба с нефтяными пятнами. Нефтяные пятна растекались тонкими плёнками по поверхности воды, препятствуют нормальному функционированию экологических сообществ. Решению данной экологической проблемы мы посвятили свою работу.

Цель работы:

Выведение новых штаммов анаэробных микроорганизмов поглощающих нефть.

Задачи:

1. Выведение штаммов сенной палочки.
2. Получение мутационных форм сенной палочки при помощи радиоактивного источника.
3. Целенаправленный отбор штамма сенной палочки способного перерабатывать углеводороды.

Гипотеза:

При облучении штаммов сенной палочки радиоактивным источником возможно появление организмов перерабатывающих углеводороды.

СОДЕРЖАНИЕ

Аннотация

- 1.1. Описание *Bacillus subtilis*
- 1.2. Физиология спорообразующих бактерий
- 1.3. Генетический аппарат бактерий
- 1.4. Горизонтальный перенос генов
- 1.5. Распространение аэробных спорообразующих бактерий
- 1.6. Выведение штаммов сенной палочки
 - 1.6.1. Методы посевов
 - 1.6.2. Приготовление питательной среды
 - 1.6.3. Этапы выделения чистой культуры

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

- 2.1. Размножение сенной палочки
- 2.2. Получение мутантных форм сенной палочки
- 2.3. Целенаправленный отбор сенной палочки с необходимыми признаками

2.4 Результаты опытов

2.5 Выводы

2.6 Перспективы дальнейших исследований

4. Приложения

5. Список литературы

Аннотация

Нефть в современном мире играет ключевую роль в энергетике любой развитой страны. Вместе с тем использование углеводородов создаёт целый ряд проблем экологического характера. Своей работой мы предприняли попытку решить одну из таких проблем, а именно проблему нефтяных пятен на поверхности воды и в толщине почвы. Последние крупные аварии 2010 года, связанные с выбросом углеводородов в воду показали несовершенство методов используемых человеком для борьбы с нефтяными пятнами.

Своими исследованиями мы доказали возможность создания микроорганизмов эффективно перерабатывающих углеводороды. Объектом нашего исследования после тщательного анализа кандидатов выступила Сенная палочка (*Bacillus subtilis*). Основная идея нашего опыта заключалась в генетической модификации бактерии радиацией (получение большого количества мутантных форм) и последующий отбор по необходимым нам признакам (возможность жить, размножаться и питаться в углеводородной среде).

1.1 Описание *Bacillus subtilis*

Сенная палочка - подвижная палочковидная бактерия длина, которой составляет около 5, а диаметр — 0,7 мкм. Аэроб. Широко распространена в почве, на растительных остатках. Разлагает органические вещества, нередко вызывает порчу пищевых продуктов.

В присутствии кислорода образует споры, что позволяет ей длительный период сохраняться во внешней среде. Высокая биологическая активность является ее отличительной особенностью. Согласно данным литературных источников, сенная палочка имеет высокую изменчивость, что затрудняет ее идентификацию по культуральным свойствам. Так, у *Bacillus subtilis* отмечается до 10 типов колоний при выращивании на различных агаризированных средах.

В клетках бацилл нуклеотиды расположены вдоль продольной оси клетки и локализованы в сферические, удлинённые или палочковидные компактные структуры. Перед делением шаровидный нуклеотид вытягивается, последовательно приобретая овальную, бобовидную гантелевидную форму, с последующим делением путем перетяжки. Ядро состоит из линейной хромосомной ДНК. Вместе с тем в клетках многих штаммов бацилл обнаружена внехромосомная ковалентно замкнутая кольцевая ДНК, называемая плазмидной ДНК.

Генетическая роль плазмид изучена недостаточно. Многие авторы предполагают, что плазмиды участвуют в регуляции процессов спорогенеза и антибиотикообразования.

Размножаются бациллы путем деления клетки. Интенсивность роста и развития культур зависит от рационального соотношения минеральных и органических веществ в питательной среде.

Процесс спорообразования зависит от источников питания. Бациллы активно образуют споры на пептонно-кукурузном агаре и разведенном МПБ. На синтетических средах аэробные бациллы образуют мало спор. Споры прорастают в три стадии.

Таким образом, бациллы, благодаря спорообразованию, обладают высокой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды и широко распространены в природе

1.2 Физиология спорообразующих бактерий.

Аэробные бациллы имеют гамму различных физиологических признаков. Наличие у споровых бактерий разных механизмов переноса электронов обуславливает отличие их физиологических признаков при культивировании в различных средах. Так, клетки *Bacillus subtilis* при выращивании на сложный триптон – дрожжевой среде с глюкозой характеризуются активным дыханием и одновременно снижением способности к ферментации, а клетки, выращенные на синтетической среде, теряют способность к брожению и окисляют глюкозу в процессе дыхания. При этом выявлены качественные изменения в составе ферментов.

Согласно исследованиям, у бактерий рода *Bacillus subtilis* преобладает гликолитический путь расщепления углеводов независимо от наличия в среде кислорода.

Таким образом, для нормального роста и развития бактерий необходимы микро- и макроэлементы, и, изменяя их концентрацию в среде, можно ускорить или замедлить рост бацилл. Наличие различных путей усвоения углерода, широкие ассимиляционные возможности способствуют распространению этих бактерий в природе и обуславливают их адаптивные свойства. Большое практическое значение имеет свойство ряда бацилл восстанавливать нитриты, расщеплять ксилит и усваивать лигнин и целлюлозу.

1.3 Генетический аппарат бактерий

Основу наследственного аппарата бактерий, как и всех других организмов, составляет ДНК (у РНК-содержащих вирусов — РНК).

Наряду с этим наследственный аппарат бактерий и возможности его изучения имеют ряд особенностей:

бактерии — гаплоидные организмы, т. е. они, имеют 1 хромосому. В связи с этим при наследовании признаков отсутствует явление доминантности;

- бактерии обладают высокой скоростью размножения, в связи, с чем за короткий промежуток времени (сутки) сменяется несколько десятков поколений бактерий. Это дает возможность изучать огромные по численности популяции и достаточно легко выявлять даже редкие по частоте мутации. Наследственный аппарат бактерий представлен хромосомой. У бактерий она одна. Если и встречаются клетки с 2, 4 хромосомами, то они одинаковые.

Хромосома бактерий — это молекула ДНК. Длина этой молекулы достигает 1,0 мм и, чтобы "уместиться" в бактериальной клетке, она не линейная, как у эукариотов, а суперспирализована в петли и свернута в кольцо. Это кольцо в одной точке прикреплено к

цитоплазматической мембране. На бактериальной хромосоме располагаются отдельные гены. У кишечной палочки, например, их, более 2 тыс.

2. Генотип (геном) бактерий представлен не только хромосомными генами. Функциональными единицами генома бактерий, кроме хромосомных генов, являются:

- IS-последовательности;
- транспозоны;
- плазмиды.

IS-последовательности — короткие фрагменты ДНК. Они не несут структурных (кодирующих тот или иной белок) генов, а содержат только гены, ответственные за транспозицию (способность IS-последовательностей перемещаться по хромосоме и встраиваться в различные ее участки). IS-последовательности одинаковы у разных бактерий. Транспозоны — это молекулы ДНК, более крупные, чем IS-последовательности. Помимо генов, ответственных за транспозицию, они содержат и структурный ген, кодирующий тот или иной признак.

Транспозоны легко перемещаются по хромосоме. Их положение сказывается на экспрессии, как их собственных структурных генов, так и соседних хромосомных. Транспозоны могут существовать и вне хромосомы, автономно, но неспособны к автономной репликации.

Плазмиды — кольцевые суперспиралевидные молекулы ДНК. Их молекулярная масса колеблется в широких пределах и может быть в сотни раз больше, чем у транспозонов.

Плазмиды содержат структурные гены, наделяющие бактериальную клетку разными, весьма важными для нее свойствами:

- R-плазмиды — лекарственной устойчивостью;
- Col-плазмиды — способностью синтезировать колицины;
- F-плазмиды — передавать генетическую информацию;
- Шу-плазмиды — синтезировать гемолизин;
- Тох-плазмиды — синтезировать токсин;
- плазмиды биодegradации — разрушать тот или иной субстрат и т. д.

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

Многие плазмиды имеют в своем составе гены трансмиссивности и способны передаваться от одной клетки к другой при конъюгации (обмене генетической информацией). Такие плазмиды называются трансмиссивными.

3. Наличие F-плазмиды (фактор фертильности, половой фактор)

придает бактериям функции донора, и такие клетки способны передавать свою генетическую информацию другим, F-клеткам. Можно сказать, что наличие F-плазмиды является фенотипическим выражением (проявлением) пола у бактерий: с F-плазмидой

связана не только донорская функция, но и некоторые другие фенотипические признаки — наличие F-пилей (половых ресничек) и чувствительность к L-фагам. С помощью F-ресничек устанавливается контакт между донорскими и реципиентными клетками. Через их канал и передается донорская ДНК при рекомбинации. На половых ресничках расположены рецепторы для мужских f₁-фагов. F-клетки не имеют таких рецепторов и нечувствительны к таким фагам.

4. У бактерий различают 2 вида изменчивости — фенотипическую и генотипическую.

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

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

Мутации бактерий принципиально не отличаются от мутаций эукариотических клеток. Особенностью мутаций у бактерий является относительная легкость их выявления, так как имеется возможность работать с большими по численности популяциями бактерий. По происхождению мутации могут быть:

- спонтанными;
- индуцированными. По протяженности:
- точечными;
- генными;
- хромосомными. По направленности:
- прямыми;
- обратными.

Рекомбинации (обмен генетическим материалом) у бактерий отличаются от рекомбинаций у эукариот:

- у бактерий имеется несколько механизмов рекомбинаций;
- при рекомбинациях у бактерий образуется не зигота, как у эукариот, а мерозигота (несет полностью генетическую информацию реципиента и часть генетической информации донора в виде дополнения);
- у бактериальной клетки-рекомбината изменяется не только качество, но и количество генетической информации. Трансформация — это обмен генетической информацией у бактерий путем введения в бактериальную клетку-реципиент готового препарата ДНК (специально приготовленного или непосредственно выделенного из клетки-донора). Чаще всего передача генетической информации происходит при культивировании реципиента на питательной среде, содержащей ДНК донора. Для восприятия донорской ДНК при трансформации клетка-реципиент должна находиться в определенном физиологическом состоянии (компетентности), которое достигается специальными методами обработки бактериальной популяции.

При трансформации передаются единичные (чаще 1) признаки. Трансформация является самым объективным свидетельством связи ДНК или ее фрагментов с тем или иным

фенотипическим признаком, поскольку в реципиентную клетку вводится чистый препарат ДНК.

Трансдукция— обмен генетической информацией у бактерий путем передачи ее от донора к реципиенту с помощью умеренных (трансдуцирующих) бактериофагов.

Трансдуцирующие фаги могут переносить 1 или более генов (признаков). Трансдукция бывает:

- специфической — переносится всегда один и тот же ген;
- неспецифической — передаются разные гены.

Это связано с локализацией трансдуцирующих фагов в геноме донора:

- в случае специфической трансдукции они располагаются всегда в одном месте хромосомы;
- при неспецифической их локализация непостоянна. Конъюгация — обмен генетической информацией у бактерий путем передачи ее от донора к реципиенту при их прямом контакте. После образования между донором и реципиентом конъюгационного мостика одна нить ДНК-донора поступает по нему в клетку-реципиент. Чем дольше контакт, тем большая часть донорской ДНК может быть передана реципиенту.

Основываясь на прерывании конъюгации через определенные промежутки времени, можно определить порядок расположения генов на хромосоме бактерий — построить хромосомные карты бактерий (произвести картирование бактерий).

Донорской функцией обладают F⁺-клетки.

1.4 Горизонтальный перенос генов

У прокариот может происходить частичное объединение геномов. При конъюгации клетка-донор в ходе непосредственного контакта передает клетке-реципиенту часть своего генома (в некоторых случаях весь). Участки ДНК донора могут обмениваться на гомологичные участки ДНК реципиента. Вероятность такого обмена значима только для бактерий одного вида. Аналогично бактериальная клетка может поглощать и свободно находящуюся в среде ДНК, включая её в свой геном в случае высокой степени гомологии с собственной ДНК. Данный процесс носит название трансформация. В природных условиях протекает обмен генетической информацией при помощи умеренных фагов (трансдукция). Кроме этого, возможен перенос нехромосомных генов при помощи плазмид определённого типа, кодирующих этот процесс, процесс обмена другими плазмидами и передачи транспозон.

При горизонтальном переносе новых генов не образуется (как то имеет место при мутациях), однако осуществляется создание разных генных сочетаний. Это важно по той причине, что естественный отбор действует на всю совокупность признаков организма.

1.5 Распространение аэробных спорообразующих бактерий

В большом количестве они находятся в почве. Бациллы, содержащиеся в почве, отличаются меньшими размерами клеток, чем в лабораторной культуре. Наряду с обычными палочковидными клетками встречаются клетки в виде кокков, которые жизнеспособны и при определенных условиях приобретают форму палочки, свойственную данному виду. Экология и содержание бацилл в почвах зависят от состава

почвы, ее адсорбционных свойств, температуры, уровня почвенных вод, растительного покрова и др. Бациллы довольно часто встречаются в воде озер, морей и океанов. Аэробные бациллы в значительных количествах содержатся и в микрофлоре воздуха.

Таким образом, аэробные спорообразующие бактерии широко распространены в природе благодаря тому, что обладают высокими адаптивными свойствами и могут существовать в экстремальных условиях.

1.6 Выведение штаммов сенной палочки

Для получения культуры сенной палочки необходимо взять немного сена, положить его в колбу с водой, отверстие колбы закрыть ватным тампоном и прокипятить в течение 30 минут. Полученный раствор отфильтровать и поставить в теплое место (оптимальной является температура в 25—26 °С). Через 3—4 дня на поверхности жидкости появится бактериальная пленка. Это культура сенной палочки.

1.6.1 Методы посевов

Важным этапом бактериологического исследования является посев. В зависимости от цели исследования, характера посевного материала и среды используют разные методы посева. Все они включают обязательную цель: оградить посев от посторонних микробов. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, усиливающих колебания воздуха. Во время посевов нельзя разговаривать. Посев лучше делать в боксе (при работе с заразным материалом необходимо выполнять правила личной безопасности).

Питательные среды для микроорганизмов и их приготовление

1.6.2 Приготовление питательной среды

В 1 литре воды кипятят 100 г белой фасоли или белых бобов до готовности, избегая растрескивания бобов и превращения крахмала в клейстер. Отвар фильтруют в горячем виде и добавляют 2% агара. Стерилизуют в автоклаве как обычно. Форма, размеры и строение бактериальной клетки

1.6.3 Этапы выделения чистой культуры:

1-й день — получение изолированных колоний. Кашп исследуемого материала петлей, пипеткой или стеклянной палочкой наносят на поверхность агара в чашке Петри. Шпателем втирают материал в поверхность среды; не прожиг и не перевертывая шпателя, производят посев на 2-й, а тем на 3-й чашке. При таком посеве на 1-ю чашку приходится много материала и соответственно много микробов, на 2-ю меньше и на 3-ю еще меньше.

Можно получить изолированные колонии при посеве петлей. Для этого исследуемый материал эмульгируют в бульоне или изотоническом растворе натрия хлорида.

2-й день — изучают рост микробов на чашках. В 1-й чашке обычно бывает сплошной рост — выделить изолированную колонию не удастся. На поверхности агара во 2-й и 3-й чашке вырастают изолированные колонии. Их изучают невооруженным глазом, с помощью лупы, при малом увеличении микроскопа и иногда в стереоскопическом микроскопе. Нужную

колонию отмечают со стороны дна чашки и пересевают на скошенный агар. Посевы ставят в термостат. (Пересевать можно только изолированные колонии.)

3-й день — изучают характер роста на скошенном агаре. Делают мазок, окрашивают его и, убедившись в том, что культура чистая, приступают к ее изучению. На этом выделение чистой культуры заканчивается. Выделенная из определенного источника и изученная культура называется «штамм».

2. Практическая часть

Для реализации цели нашей работы нам было необходимо решить практические задачи, стоящие перед нами. Первая – задача правильно выбрать объект исследований (из огромного числа микроорганизмов с уникальными свойствами). При выборе объекта для нашего исследования мы руководствовались следующими критериями:

- Концентрация микроорганизмов должна быть максимальной в поверхностном слое воды;
- микроорганизмы должны активно питаться углеводородами, причём как можно большей их частью (предельными, непредельными, с большой и маленькой молекулярной массой);
- быть устойчивыми и жизнеспособными в широком интервале температур;
- также данные организмы не должны быть патогенными для организма человека, и не наносить вреда водным экологическим сообществам.

Проанализировав вышеприведённые критерии, мы остановили свой выбор на сенной палочке.

Достоинства выбранного микроорганизма для выполнения наших задач:

- живёт и размножается в поверхностном слое воды, т.е. максимальная численность в нефтяном слое;
- относится к аэробам, т.е. использует атомарный кислород воздуха, не уменьшая концентрацию кислорода в воде и быстрее, чем анаэробы утилизирует органические вещества;
- быстро размножается, следовательно, скорость утилизации нефти на поверхности воды будет большой;
- способна образовывать устойчивые к внешним воздействиям споры, следовательно возможно удобное хранение и транспортировка препаратов содержащих данные организмы;
- непатогенная, следовательно, не вызывает болезней человека и не вредит экологическим сообществам;

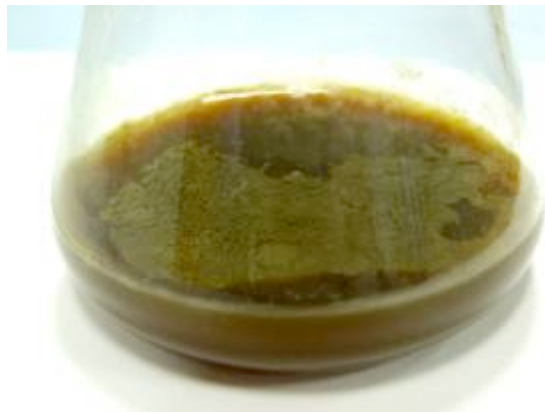
Недостатки использования данных организмов тоже есть, но они не столь существенны по сравнению с достоинствами.

2.1 Размножение сенной палочки

Для получения культуры сенной палочки была взята коническая колба ($V=250$ мл.) в неё поместили 30г. сухого сена.



В колбу залили 200 мл. дистиллированной воды, закрыли горлышко фильтровальной бумагой и прокипятили в течении 30 минут на электрической плитке. Все дальнейшие манипуляции проводились в специально созданной нами стерильной многоцелевой, беспылевой камере (см. приложение 2). Затем колба была охлаждена в течении 2-х часов и полученный настой отфильтрован в стерильную коническую колбу (V=250 мл.). Колба находилась при температуре 26 0С в течении 3-х суток.



За это время на поверхности настоя появилась плёнка содержащая штаммы бактерий сенной палочки. Плёнка была разделена на 4-ре части и помещена в чашки Петри с жидкой и гелеобразной питательной средой.



Первая линия исследования (линия А) получала максимально возможное облучение, для формирования как можно большего количества мутаций у материнских особей, но после дочерние формы больше не облучались. Отбор данной линии проводился в жидкой среде. Вторая линия исследования (линия В) отличалась от линии А тем, что дочерние особи показавшие наилучшую поглощаемость углеводов подвергались

дополнительному облучению в течении 2-х часов перед высевом в питательную среду. Размножение штаммов линии В проходило в жидкой питательной среде. Линия С отличалась от А гелеобразной питательной средой в которую были введены предельные углеводороды (равномерно распределены в питательной среде). Один опыт стал контрольным (линия D).

2.2 Получение мутантных форм сенной палочки

Для получения мутаций сенной палочки мы воспользовались радиоактивным цезиевым источником радиации прибора ИМД-5. Получение максимального возможного количества мутаций возможно изменением либо мощности радиационного источника, либо изменением времени облучения штаммов микроорганизмов. Второй способ оказался для нас более удобен, поэтому мы провели серию опытов с целью определить время, приводящее к возникновению большого количества мутантных форм, но небольшому количеству летальных мутаций. Проведение предварительного опыта показало, что при постоянной мощности цезиевого источника и расстояния от него, облучение бактериальных клеток должно проводиться в пределах 6-7 часов. Большие значения приводят к резкому увеличению количества летальных мутаций и снижению численности особей в колонии.



Мутационные формы микроорганизмов рассматривались нами через биологический микроскоп при увеличении в 1350 раз.

2.3 Целенаправленный отбор сенной палочки с необходимыми признаками

Для проведения целенаправленного отбора микроорганизмов с нужными для нас свойствами мы определили перечень требований для искусственного отбора:

- выведенный штамм микроорганизмов должен энергично перерабатывать жидкие и твёрдые углеводороды;
- процессы жизнедеятельности должны активно проходить в широком интервале температур.



В качестве углеводородов добавляемых в питательную среду микроорганизмам мы использовали смесь, состоящую из 80% вазелинового масла и 20% парафиновых твёрдых фракций нефти. Для получения смесь нагревалась и тщательно перемешивалась. Достоинство данной смеси заключается в том, что уже при температуре +80С эта смесь углеводородов переходит в твёрдое состояние. В центральную часть колоний сенной палочки помещалась взвешенная на весах с точностью до 0.01 капля углеводородов, и чашка Петри оставлялась на трое суток в стерильном

боксе с промежуточным фотографированием стробоскопическим устройством с интервалом 2 часа.

Через трое суток чашка Петри помещалась в холодильник для затвердевания смеси углеводов. Твёрдые частицы углеводов промывались, сушились и взвешивались для определения массы поглощённого вещества. В случае существенной разницы между начальной и конечной массой из центральной части колонии сенной палочки, в которой находилась капля углеводов, изымались пробы микроорганизмов и вновь помещались в свежеприготовленную питательную среду. Отбор бактерий повторялся до получения удовлетворительных результатов опыта. Сравнение мутационных изменений проводилось с контрольным образцом штаммов, который не подвергался облучению. Цезиевый источник ионизирующего излучения вызывает, как правило, точечные мутации, поэтому получение нужных результатов носит случайный, характер.

2.4 Результаты опытов

Наилучших результатов мы добились, выведя штамм ВЗ-26. Он был получен в результате 5-ти часового облучения цезиевым источником, с отбором и последующим высевом центральной колонии сенной палочки, затем с дополнительным облучением в течении 2-х часов каждого последующего поколения радиоактивным излучением. Данный штамм бактерий при проведении контрольных опытов показывает стабильные результаты с расщеплением в среднем 76-80% введённых углеводов за трое суток опыта.

Контрольные опыты по мутантному штамму микроорганизмов					
Сенной палочки БЗ-26					
№ опыта	Время проведения (часы)	Масса углеводородного образца до начала опыта (г)	Масса углеводородного образца после окончания опыта (г)	Температура	Процент разрушения углеводов
1	72	4,2	1,01	21	76,05
2	72	4,13	0,835	21	79,8
3	72	4,35	0,98	21	77,5

Штаммы микроорганизмов линии А поглощали в среднем 9-14% углеводов. Позитивной динамики поглощения углеводов выявлено не было. Разведение бактерий в гелеобразной среде содержащей углеводороды (вазелиновое масло в питательной среде) при постановке контрольного опыта (разведение в жидкой среде с добавлением смеси жидких и твёрдых углеводов) показало стабильные результаты всех контрольных опытов в районе 27-34% разрушения углеводов. В контрольном опыте (линия D) поглощение углеводов составило менее 1% массы введённого углеводорода.

2.5 Выводы

1. Доказана возможность использования мутантных аэробных бактерий сенной палочки для поглощения углеводов.
2. Поглощение углеводов сенной палочкой не носит избирательный характер (проведённый анализ показал расходование как жидких, так и твёрдых парафиновых фракций).
3. Имеется чётко выраженная закономерность увеличения поглощения микроорганизмами углеводов с повышением температуры питательной среды (исследовано в интервале 18-240С)

2.6 Перспективы дальнейших исследований

1. Провести исследование продуктов распада углеводов.
2. Провести направленное выведение микроорганизмов более устойчивых к перепадам температуры на основе штамма БЗ-26.
3. Провести опыт по разрушению штаммом БЗ-26 углеводов сырой природной нефти.

Оборудование, использованное при проведении эксперимента

	
<p>Биологический микроскоп</p>	<p>Окуляр 15x и объектив 90x</p>
	
<p>Прибор для измерения радиации ИМД - 5</p>	<p>Радиационный источник прибора ИМД-5 помещённый в контейнер</p>
	
<p>Беспылевая камера</p>	<p>Набор посуды</p>

Список литературы

1. Тульчинская, В.П., Юргелайтис, Н.Г. Растения против микробов. – Киев, 1987.
2. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология. 2003 г.
3. [Котова И.Б.](#) [Нетрусов А.И.](#) Общая микробиология: Учебник для вузов. - [Академия](#), 2007.
4. Иванова Е.Ю. Микробиология: Учебно-методическое пособие. - Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. - 23 с.
5. М.В.Гусев, Л.А.Минеева Микробиология: Учебник для студентов биологических специальных ВУЗов. - "Академия, 2003. - 464 с.

Работа выполнена учеником 9-го класса Мальковым Алексеем Владимировичем, соавтором практической части работы является ученик 7-го класса Панфилий Тимофей.