

И. М. Мокшина ♦ Н. Н. Мюрова

Практикум по **МИКРО** **БИОЛОГИИ**

Учебное
пособие

УДК 579.2
ББК Е4я73-5
М77

Р е ц е н з е н т ы :

Ю. В. БАТАЕВА,
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биотехнологии
ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет —
МСХА им. К. А. Тимирязева»;

Н. А. СЕДОВА,
доктор биологических наук, доцент,
профессор кафедры «Водные биологические ресурсы, рыболовство
и аквакультура», ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»

А в т о р ы - с о с т а в и т е л и :

И. М. МОНТИНА, Н. Н. МИНИНА

М77 **Монтин И. М., МИНИНА Н. Н. Практикум по микробиологии:** учебное пособие / И. М. Монтин, Н. Н. Минина. — Ростов-на-Дону: Манускрипт, 2024. — 159 с. (Электронное издание комплексного распространения).

УДК 579.2
ББК Е4я73-5

ISBN 978-5-6053359-0-0

Учебное пособие разработано в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования (ФГОС ВО) и предназначается для студентов, обучающихся по направлениям 44.03.05 — Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки) и 06.03.01 — Биология.

В издании подробно описаны структура микробиологической лаборатории, а также основные виды лабораторного оборудования; освещены особенности приготовления микропрепаратов и питательных сред; показаны взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой; представлены некоторые аспекты теории и практики санитарной микробиологии.

Пособие предназначено для студентов и магистрантов по указанным направлениям подготовки, а также может быть полезно всем, интересующимся теорией и практикой микробиологических исследований.

© Монтин И. М., Минина Н. Н., 2024
© ООО «Издательство "Манускрипт"», 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	7
Тема 1. Структура микробиологической лаборатории	8
1.1. Характеристика микробиологической лаборатории	8
1.2. Группы возбудителей инфекционных заболеваний	8
1.3. Типы микробиологических лабораторий	10
1.4. Правила работы в микробиологической лаборатории	10
Тема 2. Лабораторное оборудование	12
2.1. Виды лабораторного оборудования	12
2.2. Строение и правила эксплуатации микроскопа. Виды микроскопов	13
2.2.1. Устройство световых микроскопов	13
2.2.2. Классификация существующих микроскопов	20
2.3. Основное общелабораторное оборудование	25
Контрольные вопросы и задания	37
2.4. Оборудование для дезинфекции и стерилизации. Правила эксплуатации оборудования	32
Контрольные вопросы и задания	44
2.5. вспомогательное оборудование	45
2.6. Оборудование, используемое для перемешивания и разделения	52
Контрольные вопросы и задания	54
2.7. Лабораторная посуда для микробиологической лаборатории	524
Контрольные вопросы	59
Задания для самостоятельной работы	59
Тема 3. Приготовление и способы окраски препаратов микроорганизмов разных видов	60
3.1. Основные правила приготовления микропрепаратов	60
3.2. Виды микропрепаратов	63

3.3. Препараты живых клеток	64
<u>Практические задания:</u>	
1. Приготовление препарата «раздавленная капля»	65
2. Приготовление препарата «висячая капля»	66
3. Приготовление микропрепарата «отпечаток»	66
4. Приготовление препарата «микрокультура»	67
5. Приготовление препаратов фиксированных клеток	68
Контрольные вопросы	72
3.4. Виды окрасок микропрепаратов	72
<u>Практические задания:</u>	
1. Простая окраска	73
2. Окраска по Граму	74
3. Выявление спор в клетках бактерий	75
4. Выявление включений в клетках микроорганизмов	77
5. Техника выявления капсул	80
Контрольные вопросы	81
Тема 4. Питательные среды. Классификация. Получение	82
4.1. Назначение питательных сред	82
4.2. Классификация и применение питательных сред	83
<u>Практические задания:</u>	
1. Приготовление питательных сред	86
2. Посев на питательную среду	87
Контрольные вопросы	91
4.3. Получение и выделение чистых культур микроорганизмов	92
<u>Практические задания:</u>	
1. Выделение чистых культур микроорганизмов различными методами: Пастера, Коха, фракционированного посева	93
2. Выделение чистых культур анаэробов	96
3. Выделение спорообразующих бактерий	98
4. Описание культуральных особенностей бактерий	100
Контрольные вопросы	102

Тема 5. Взаимоотношения микроорганизмов	103
5.1. Трансформация веществ в процессе жизнедеятельности микроорганизмов	103
5.2. Молочнокислое брожение	104
<u>Практические задания:</u>	
1. Изучение бактерий — возбудителей гомоферментативного молочнокислого брожения	107
2. Определение в кефире молочной кислоты пробой с фенолом (реакция Уффельмана)	108
3. Изучение бактерий гетероферментативного молочнокислого брожения	109
4. Обнаружение молочной кислоты в рассоле овощей	110
Контрольные вопросы	110
5.3. Спиртовое брожение	111
<u>Практические задания:</u>	
1. Изучение дрожжей — возбудителей спиртового брожения	112
2. Проведение качественной реакции процесса спиртового брожения. Определение этилового спирта . . .	113
3. Определение уксусного альдегида	113
Контрольные вопросы	113
5.4. Маслянокислое брожение	113
<u>Практические задания:</u>	
1. Изучение культуры маслянокислого брожения крахмала	116
2. Изучение культуры и бактерии маслянокислого брожения клетчатки	118
3. Изучение культуры маслянокислого брожения пектиновых веществ.	118
Контрольные вопросы	119
5.5. Уксуснокислое брожение	120
<u>Практические задания:</u>	
Изучение уксуснокислых бактерий	121
Контрольные вопросы	123

Тема 6. Микрофлора воздуха, почвы и воды	124
6.1. Изучение микрофлоры воздуха	124
<u>Практические задания:</u>	
Изучение микрофлоры воздуха	126
Контрольные вопросы	126
6.2. Изучение микрофлоры почвы	127
<u>Практические задания:</u>	
1. Изучение микрофлоры почвы	129
2. Изучение культуры бактерий денитрификаторов	130
3. Изучение культуры бактерий аммонификаторов	131
4. Изучение жидкой культуры свободноживущих азотфиксирующих бактерий	132
5. Изучение микроорганизмов аэробного разложения клетчатки	133
6. Изучение клубеньковых бактерий	133
Контрольные вопросы	134
6.3. Изучение микрофлоры воды	134
<u>Практические задания:</u>	
1. Определение общего количества микробов (ОМЧ) в воде	135
2. Определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ) воды	135
Контрольные вопросы	137
6.4. Методы количественного определения микробов в исследуемых объектах	138
Список использованных источников	140
Примерные тестовые задания	149



Введение

Учебное пособие «Практикум по микробиологии» может быть использовано для изучения теоретического материала, а также подготовки к лабораторным занятиям и экзаменам.

Предлагаемое издание позволит студентам познакомиться со структурой микробиологической лаборатории, основными видами оборудования, а также особенностями приготовления микропрепаратов, питательных сред, трансформацией веществ, происходящей с участием микроорганизмов, и некоторыми аспектами теоретического и практического изучения санитарной микробиологии.

Практикум составлен в классическом стиле, для наглядности снабжен иллюстрациями (в виде цветных и черно-белых фотографий). Каждая тема включает в себя практические задания и контрольные вопросы, позволяющие закрепить изученный материал.

Данное пособие разработано в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования (ФГОС ВО) и предназначается для студентов, обучающихся по направлениям 44.03.05 — Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки) и 06.03.01 — Биология.



Тема 1

Структура микробиологической лаборатории

1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

В соответствии с типами микроорганизмов, которые изучаются вирусологами, микробиологами и санитарными врачами, выделяют вирусологические, микологические, бактериологические и протозоологические лаборатории.

Объекты изучения микробиологических лабораторий — патогенные биологические агенты (ПБА) — это патогенные для человека микроорганизмы (грибы, вирусы, простейшие, бактерии), модифицированные генно-инженерным способом микроорганизмы, токсины биологического происхождения (биологические яды), гельминты, а также биологический материал организма человека (включая биологические жидкости, кровь и экскременты человека), подозрительный на содержание патогенных биологических агентов.

Микробиологические лаборатории в зависимости от выполняемых исследований подразделяются на научно-исследовательские, диагностические и производственные.

С возбудителями инфекционных заболеваний можно работать только в специализированных лабораториях, которые обеспечивают безопасность работы её персонала и полностью исключают попадание патогенных микроорганизмов в среду за пределами лаборатории.

1.2. ГРУППЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Работа в микробиологической лаборатории требует соблюдения специальных правил, так как исследования проводят с использованием заразного материала от экспериментальных и больных животных, а также культур патогенных микроорганизмов. Соблюдение данных правил необходимо для обеспечения не только личной безопасности сотрудников лаборатории, но и безопасности всех окружающих.

Регламентация условий работы с возбудителями инфекционных заболеваний производится в соответствии со степенью опасности микроорганизма для человека.

В России приняты санитарные правила, которые устанавливают требования к организационным и санитарно-противоэпидемическим (профилактическим) мероприятиям, направленным на обеспечение личной и общественной безопасности, защиту окружающей среды при работе с патогенными биологическими агентами (СанПиН 3.3686–21).

Микроорганизмы по степени опасности возможного заражения работающих с ними лиц подразделяются на четыре группы, согласно классификации, действующей на территории Российской Федерации:

— **группа I:** возбудители особо опасных инфекций. Возбудители чумы, геморрагических лихорадок Эбола и Марбург (филовирусы), Ласса, Хунин, Мачупо, Себиа, Гуанарит (аренавирусы), натуральной оспы человека и обезьян (поксвирусы);

— **группа II:** возбудители высококонтагиозных бактериальных грибковых и вирусных инфекций (сибирская язва, холера, блостомикоз, лихорадка Скалистых гор, сыпной тиф, бешенство, туляремия, бруцеллез, гистоплазмоз, сап, Ку-лихорадка, кокцидиозидоз, ВИЧ, гепатиты В, С, D, клещевой энцефалит, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота («коровье бешенство»), орнитоз и др.). В эту группу также включен ботулотоксин (но не сам возбудитель ботулизма);

— **группа III:** возбудители бактериальных грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенные в отдельные нозологические формы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулёза, кандидоза, малярии, лейшманиоза, гриппа, дифтерии, лепры, возвратного тифа, полиомиелита, брюшного тифа, дизентерии, некоторых микозов, гриппа, полиомиелита, гепатитов А, Е, хламидиозов (трахомы, урогенитального хламидиоза, пневмонии) и др.). В эту группу также включены аттенуированные штаммы бактерий групп I, II и III;

— **группа IV:** возбудители бактериальных, вирусных, грибковых септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и острых отравлений, а также возбудители анаэробных газовых инфекций, синегнойной инфекции, аспергиллёза, амебиоза, конъюнктивитов, аденовирусы, ОРВИ, герпесвирусы септицемии, кандидозов; микробы — показатели санитарного состояния объектов окружающей среды и др.

Работа с особо опасными микроорганизмами обязательно регламентируется специальной инструкцией и проводится в режимной лаборатории.

Работа с возбудителями III и IV групп проводится в соответствии с правилами техники безопасности, устройства, производственной санитарии в лабораториях санитарно-эпидемиологических станций и других микробиологических лабораториях.

1.3. ТИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

Микробиологические лаборатории подразделяют на следующие виды:

- лабораториям лечебно-профилактического учреждения;
- лаборатории разных комитетов Государственного санитарного эпидемиологического надзора;
- лаборатории микробиологические, учебные, состоящие в структуре вуза;
- лаборатории проблемные или отраслевые в составе институтов, научно-исследовательских центров, предприятий для выпуска различных бактериальных препаратов;
- лаборатории специализированные (для контроля за особо опасными инфекционными заболеваниями);
- лаборатории специализированная (для контроля за разными группами бактерий — микобактерии, риккетсии, лептоспиры и пр.).

Значительная часть существующих микробиологических лабораторий занимается изучением ПБА (патогенных биологических агентов) III и IV групп, а исследования, связанные с возбудителями особо опасных инфекционных заболеваний (I и II группы) проводят исключительно узкоспециализированные лаборатории.

1.4. ПРАВИЛА РАБОТЫ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. В лаборатории студенты должны работать в специальной медицинской одежде (халат, головной убор).

2. В лаборатории запрещается принимать пищу и пить. После работы или перед едой во время перерыва необходимо тщательно мыть руки с мылом.

3. Все флаконы с реактивами и другое оборудование рабочего места должны находиться в специальной кювете. Реактивы из флаконов следует брать только чистыми пипетками или стеклянными палочками, которые сразу же после использования промываются дистиллированной водой и лишь после этого помещаются в кювету.

4. Во избежание бактериального загрязнения стола и воздуха культуры микроорганизмов в пробирках и колбах должны быть закрыты пробками, а в чашках Петри — крышками. Во время отбора культуры для исследования пробки от сосудов нельзя класть на стол, их нужно держать в руке. Микробиологические петли, иглы, шпатели перед отбором культуры и сразу же после отбора прокаливаются в пламени спиртовки.

5. Окраску препаратов следует проводить в специальных кюветах на стеклянных штативах, промывку — в стаканах с водой. После работы кювету и стакан необходимо промывать водой.

6. Разжигать спиртовку следует непосредственно перед работой с ней, а сразу же после окончания работы накрывать пламя колпачком. Перед розжигом спиртовки необходимо проверить целостность корпуса, положение держателя фитиля в горловине корпуса и убедиться в отсутствии подтеков спирта на держателе и на корпусе. При взрыве паров спирта и его возгорании в корпусе следует закрыть горловину корпуса колпачком.

7. Для нагревания пробирок и предметных стекол в пламени спиртовки следует пользоваться держателем. Нагревание пробирок или стекол надо проводить равномерно по всей их длине; отверстие пробирок направлять вдоль стола, чтобы жидкость при выбросе не падала на окружающих.

8. Использованные предметные и покровные стекла, посуду с культурой после окончания работы с ними следует складывать в специально предназначенное для этого место или опускать в дезинфицирующий раствор.

9. После окончания занятия необходимо привести в порядок свое рабочее место, снять иммерсионное масло с объектива микроскопа фильтровальной бумагой, а затем протереть его салфеткой, увлажненной бензином. Микроскоп следует накрыть пластмассовым мешком.

На рабочем столе должно быть следующее оборудование: микроскоп, спиртовка, кювета со штативом для окраски препаратов, стакан, штатив для пробирок, половинка чашки Петри, спички, кювета с реактивами и инструментами: метиленовый синий по Лефлеру, фуксин по Цилю, раствор Люголя, иммерсионное масло, бензин, дистиллированная вода, микробиологические игла и петля, препаровальная игла, стеклянный шпатель и палочка, покровные стекла, карандаш для письма по стеклу, полоски фильтровальной бумаги, хлопчатобумажные салфетки, пипетка на 1–2 мл.



Тема 2

Лабораторное оборудование

2.1. ВИДЫ ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Согласно нормативным документам лабораторное оборудование может иметь различные названия, но принципа использования различных видов аналогичны. В зависимости от особенностей применения и сферы назначения всё лабораторное оборудование подразделяется на следующие виды:

— *общелaborаторное* — оборудование, не оказывающее или оказывающее незначительное влияние на итоги проводимых измерений и испытаний. К такому оборудованию относятся лабораторная мебель, разные нагревательные приборы без учета контроля температуры, мешалки, лабораторная посуда для общего назначения (т. е. без мерных делений) и т. п.

— *мерная посуда* — посуда, предназначенная для точного определения исследуемых объемов. К данному виду лабораторного оборудования относят пипетки, пикнометры, мерные колбы, бюретки и др.

— *измерительное оборудование* — оборудование, предназначенное для проведения лабораторных измерений и получения значений исследуемых параметров (количественных или качественных) — это различные индикаторы и измерительные средства (линейки, термометры, вольтметры, спектрометры, химические индикаторы, термоиндикатор и пр.).

— *стандартный образец, эталоны, меры* — отдельные виды средств измерения, которые предназначены для сравнения измеряемых характеристик с их установленными значениями (например, при аттестации или поверке любого измерительного оборудования, градуировке). Стандартные образцы по своему прямому назначению играют роль мер.

— *испытательное оборудование* — оборудование, которое предназначено для воссоздания всех или отдельных условий испытаний. Например, вибростенд, климатическая камера, акустическая камера и пр.

Еще одним видом лабораторного оборудования, применяемым в деятельности лабораторий, являются компьютерные системы и про-

граммное обеспечение. Они могут быть сразу встроены в измерительные или испытательные приборы, либо быть самостоятельными единицами для оснащения лаборатории.

2.2. СТРОЕНИЕ И ПРАВИЛА ЭКСПЛУАТАЦИИ МИКРОСКОПА. ВИДЫ МИКРОСКОПОВ

2.2.1. Устройство световых микроскопов

Микроскоп — прибор для исследования культур микроорганизмов и их морфологии. Обычно в лабораториях используется световой монокулярный (рис. 1) или бинокулярный микроскоп (рис. 2) с достаточно высоким увеличением.

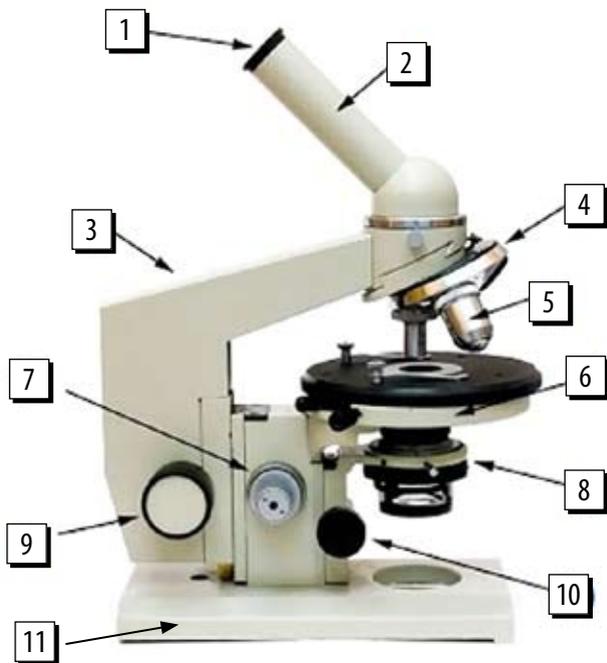


Рисунок 1. Биологический микроскоп «Биолам»:
1 — окуляр; 2 — тубус; 3 — штатив; 4 — револьверная головка;
5 — объективы; 6 — предметный столик; 7 — микрометрический
винт; 8 — конденсор; 9 — макрометрический винт;
10 — винт подъема конденсора; 11 — основание штатива
[Микробиологический практикум, 2010].



Рисунок 2. Основные части бинокулярного светового микроскопа [URL: <https://planetarium.ru/product/mikroskop-mikromed-stereo-ms-5-zoom-led/> (дата обращения: 07.06.2024)].

С помощью световых микроскопов в лаборатории можно изучать особенности строения и морфологии клеток, роста и развития различных микроорганизмов, а также проводить первичное определение изучаемых организмов, вести наблюдения за их развитием на различных субстратах.

Световые микроскопы применяют для наблюдений за прозрачными препаратами в проходящем свете (увеличение 56–1350 раз). В микробиологических лабораториях применяются световые отечественные микроскопы: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, Биолам Р-1 и др., которые предназначаются для исследований формы, структуры, размеров и других признаков разных микроорганизмов, величиной более 0,2 мкм. Световые микроскопы состоят из механической и оптической частей (рис. 1, 2).

К механической части микроскопа относятся штатив, предметный столик, тубус с встроеной револьверной головкой, винты (макро – и микрометрический). В нижней части располагается основание штатива, являющееся опорной частью микроскопа. Верхняя часть тубусодержателя несет вращающийся револьвер, в который ввинчены 3–4 объектива. При вращении револьвера один из объективов подводят под тубус. Объектив фиксируется при помощи защелкивающейся пружины. Тубусодержатель с тубусом перемещается по вертикали при помощи макрометрического винта, используемого также для грубой фо-

кусировки препарата, каждый оборот винта передвигает тубус на 20 мм. Микрометрическим винтом осуществляется тонкая фокусировка, оборот этого винта передвигает тубус на 0,1 мм.

В центре предметного столика имеется отверстие для прохождения света, освещающего препарат. В оптическую часть входят осветительный прибор, объектив и окуляр.

Осветительный прибор необходим для равномерного освещения всего поля зрения. Осветительная часть включает зеркало и конденсор с ирисовой диафрагмой. Зеркало двустороннее (одна сторона вогнутая, другая — плоская), отражает пучок лучей от осветителя в конденсор, может устанавливаться в любой из плоскостей. Вогнутая сторона зеркала используется без конденсора при слабом освещении. Плоская сторона используется с конденсором, который концентрирует параллельно идущие лучи от источника света. Конденсор является оптической системой линз.

Направление лучей от источника света через линзы конденсора к препарату показаны на рисунке 3. Линзы конденсора с ирисовой диафрагмой вставлены в цилиндрическую оправу. Ирисовая диафрагма находится под нижней линзой и включает ряд серповидных подвижных пластин. При расширении и сужении диафрагмы происходит задержка излишних лучей света и улучшается контрастность изображения. Если исследуются неокрашенные препараты, то ирисовую диафрагму необходимо прикрывать.

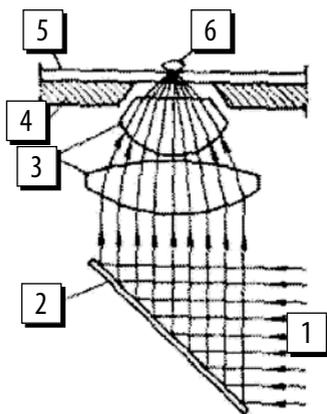


Рисунок 3. Направление лучей от источника света к объекту исследования: 1 — лучи света; 2 — зеркало; 3 — конденсор; 4 — предметный столик; 5 — предметное стекло [Микробиологический практикум, 2010].

Одной из самых важных частей микроскопа является объектив, от которого зависит разрешающая способность микроскопа и качество изображения. Объектив дает увеличенное действительное обратное изображение изучаемых объектов. В объектив входит система линз, главной из которых является наружная, или фронтальная, которая обращена к препарату. От кривизны этой линзы зависит увеличение — чем она больше, тем меньше фокусное расстояние и больше увеличение объектива, и поэтому объектив нужно опускать ниже над препаратом.

Значение увеличения объектива обозначается на его оправе. Микроскоп «Биолам» имеет три вида объективов, показывающих соответствующее увеличение: 8×, 40× и 90×. Микроскопирование в сухой системе требует использования объективов 8× и 40×, при использовании иммерсионной системы используют объектив 90×.

В объективе присутствуют коррекционные линзы. Эти линзы необходимы для большей четкости изображения и для устранения каких-либо погрешностей.

Окуляр микроскопа несет две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляр увеличивает то изображение, которое дается объективом. Увеличение окуляра пишется на оправе (15×, 10×).

ОПТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОСКОПА

Общее увеличение, которое возможно в микроскопе, определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Однако увеличение объекта еще не характеризует четкого изображения. Четкость изображения определяется разрешающей способностью микроскопа (D), определяемой как разрешающее или минимальное расстояние (d) между двумя точками, раздельно видимыми, и вычисляется по формуле:

$$D = 1/d; d = \lambda / (A_1 + A_2),$$

где d — разрешающее или минимальное расстояние между двумя точками;

λ — длина волны используемого света;

A_1 и A_2 — числовая апертура, соответственно для объектива и для конденсора. Числовая апертура (охват линзы) определяется по формуле:

$$A = n \cdot \sin u,$$

где u — половина отверстного угла α -лучей, входящих в объектив;

n — показатель преломления среды, граничащей с линзой.

Разрешающая способность микроскопа — это величина, являющаяся обратной разрешающему расстоянию. Чем меньше показатель абсолютной величины d , тем меньшего размера объект можно увидеть, и соответственно, тем выше разрешающая способность микроскопа D .

Для светового микроскопа при освещении видимым светом разрешающая способность составляет около 0,2 мкм. Для увеличения разрешающей способности (то есть для уменьшения абсолютной величины d) необходимо осветить объект светом с более короткой длиной волны λ , к примеру, ультрафиолетом, или использовать объективы с большей апертурой A_1 , или повысить апертуру конденсора A_2 . Числовая апертура для любых линз, граничащих с воздухом (сухая система), не может быть более 1, так как для воздуха показатель преломления 1, а угол u не будет более 90° , и поэтому $\sin u \leq 1$. Числовая апертура может повыситься, если увеличивается показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом, приближаясь к показателю преломления стекла ($n=1,5$). Для этой цели между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом помещается капля жидкости, показатель преломления которой больше показателя преломления воздуха, к примеру, у капли воды $n=1,3$, глицерина $n=1,4$, иммерсионного (кедровое, касторовое или терпеновое) масла $n \approx 1,5$ (рис. 4). Числовое значение апертуры объектива указывается на его оправе. Объективы $8\times$ и $40\times$ микроскопа имеют апертуру соответственно 0,20 и 0,65. У масляных (иммерсионных) объективов с увеличением $90\times$ апертура составляет 1,25.

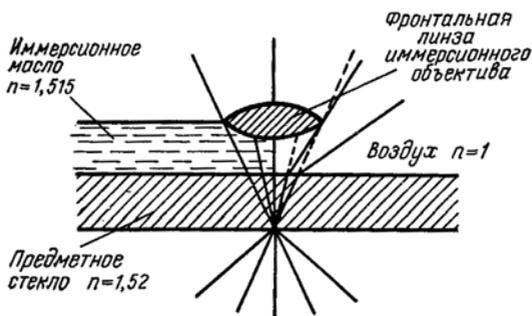


Рисунок 4. *Ход лучей в сухой и иммерсионной системе [Микробиологический практикум, 2010].*

Числовая апертура конденсора должна обязательно соответствовать числовой апертуре объектива. Если она меньше у апертуры объектива, то последняя используется не полностью, и поэтому разрешающая способность снижается. Когда апертура конденсора боль-

ше, чем апертура объектива (это бывает в сухих системах), то нужно немного прикрывать ирисовую диафрагму конденсора, это способствует устранению рассеивания света и позволяет достигать нужной контрастности изображения.

Последовательность установки света по Кёлеру:

1. Тубус поднять вверх при помощи макрометрического винта.
2. Установить объектив 8×.
3. Конденсор поднять до упора вверх.
4. Полностью открыть диафрагму конденсора, отодвинув матовое стекло, которое расположено под конденсором.
5. Установить плоское зеркало.
6. Включить осветительный прибор и поймать луч, глядя в окуляр, с помощью плоского зеркала.
7. Расположить на предметном столике лист бумаги и добиться на нем изображения четкого края светового пятна, приподнимая или опуская конденсор.
8. Приступить к микроскопированию.

ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ЭКСПЛУАТАЦИИ МИКРОСКОПА

Микроскоп необходимо разместить дальше от прямых солнечных лучей. Рабочая поверхность стола должна быть темного цвета, так как это способствует меньшему утомлению глаз.

В окуляр рекомендуется смотреть левым глазом, но, не закрывая правый. Если микроскоп имеет бинокулярную насадку, то вначале нужно отрегулировать расстояние между окулярами соответственно расстоянию между глаз, таким образом, чтобы поля видимости обоих окуляров слились в одно.

Переносить микроскоп можно только двумя руками, при этом одной держать штатив, а другой — основание микроскопа. Наклоны микроскопа в стороны при переноске недопустимы, так как из тубуса может выпасть окуляр.

Необходимо предохранять микроскоп от резких толчков, соприкосновений с сильнодействующими соединениями (кислоты, щелочи и др.). Нельзя прикасаться пальцами к поверхности линз, зеркала и светофильтров. Не следует вынимать окуляр из тубуса, чтобы в него не попала пыль и не произошло загрязнение объективов.

Во время проведения работ необходимо защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация пара может привести к порче микроскопа. Микроскоп также необходимо оберегать от сырости и пыли, хранить необходимо в футляре, под стеклянным колпаком или закрытым материей.

МИКРОСКОПИРОВАНИЕ С СУХИМИ ОБЪЕКТИВАМИ

При исследовании препаратов с сухими объективами необходимо соблюдать определенный порядок в работе.

Микроскоп нужно разместить на рабочем столе, на расстоянии 3–5 см от края, поставив тубусодержателем к себе.

Приготовленный препарат поместить на предметный столик, установив при этом нужный для наблюдения участок препарата в центре поля зрения.

Объектив 8× опустить при помощи макрометрического винта таким образом, чтобы расстояние до препарата было примерно 8 мм.

Глядя в окуляр, необходимо медленно вращать макрометрический винт, поднимая тубус до появления очертания препарата. С осторожностью поворачивая микрометрический винт, осуществить тонкую фокусировку, просматривая при этом несколько полей зрения.

После этого поднять тубус и, повернув револьвер, заменить объектив увеличения 8× объектив 40×.

Глядя сбоку, используя макрометрический винт, опустить тубус с объективом практически до касания его с препаратом.

Глядя в окуляр, очень медленно поднимать тубус до появления контуров на препарате, а затем с помощью микрометрического винта уточнить фокус.

После завершения работ необходимо снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить объектив 8×, мягкой салфеткой протереть микроскоп и убрать его в футляр.

МИКРОСКОПИРОВАНИЕ С ИММЕРСИОННЫМ ОБЪЕКТИВОМ

Подняв тубус микроскопа вверх, повернуть револьвер и установить объектив увеличением 90×.

На сухой зафиксированный препарат нанести каплю любого иммерсионного масла. Смотря сбоку, с осторожностью (не допуская смещения или повреждений фронтальной линзы) опустить объектив до полного погружения в масло с помощью макрометрического винта.

Затем нужно смотреть в окуляр и очень медленно вращать макрометрический винт на себя, извлекая объектив из масла, приподнимать тубус микроскопа до проявления контуров препарата.

Точно фокусировать объект необходимо с помощью микрометрического винта.

После окончания работ с иммерсионным объективом необходимо поднять тубус, снять препарат и с осторожностью протереть фронтальную линзу на объективе вначале сухой салфеткой, а затем слегка

смоченной салфеткой в смеси спирта и эфира (1:1), в толуоле или в очищенном бензине.

2.2.2. Классификация микроскопов

Световой микроскоп. В качестве подсветки препарата используется свет от какого-либо источника света. Световые микроскопы бывают *прямыми* и *инвертированными*. В прямых микроскопах источник света расположен снизу и свет, проходя через конденсор, попадает на столик, затем идет в объектив, а затем в окуляр. В инвертированных микроскопах источник света располагается наверху, поэтому свет падает на объект а затем выходит на конденсор и направляется в окуляр.

Световые микроскопы в зависимости от источника света бывают: микроскопы видимого света (рис. 1, 2), ультрафиолетовые и флуоресцентные (рис. 5). Ультрафиолетовый микроскоп несет встроенное устройство, образующее ультрафиолетовые лучи, в которых и видно изображение. Флуоресцентный микроскоп имеет флуоресцентный блок, в котором дополнительным источником света является ртутная лампа. В микроскопе есть флуоресцентный фильтр. Световой поток от лампы проходит через фильтр и направляется в объектив, при этом свет, заряженный определённой энергией, начинает самостоятельно светиться. Свет отражается от препарата, проходит сквозь фильтр, а затем попадает на камеру либо в окуляры (регистрирующее приспособление).



Рисунок 5. Флуоресцентные микроскопы
[URL: https://lucop.pro/oi/pm/oi-pm-nexcope/nexcope_ne950
(дата обращения: 07.06.2024)].

Электронные микроскопы. Световые микроскопы позволяют повысить разрешающие способности человеческих глаз в 1000 раз. Электронные микроскопы (рис. 6) позволяют повысить видимость объектов до 0,1 нм, что в 10^6 раз больше разрешающей способности человеческих глаз. Электронные микроскопы используют пучок электронов вместо видимого света. Длина волны электрона менее длины волны видимого света, а при напряжении между катодом и анодом в 5 кВ электрон обладает длиной волны 0,005 нм, это и дает увеличение разрешающей способности. Электронный микроскоп позволяет увидеть структуру и строение органоидов клеток прокариот и эукариот, вирусы, а также макромолекулы, например, белки, ДНК, РНК.

Роль линзы в электронных микроскопах играет круговое магнитное поле, действие заставляет электроны отклоняться или центрироваться. Затем электроны попадают на металлическую пластинку, которая покрыта тонким слоем сернистого цинка либо минерала вилемита — флуоресцирующий экран, либо на фотопластину. Сегодня существует несколько видов электронных микроскопов: трансмиссионные (просвечивающие объекты) обычные, трансмиссионные высоковольтные и сканирующие. Каждый из них имеет определенные преимущества.

Для электронной микроскопии требуется специальная сложная подготовка препаратов. В растровом электронном микроскопе используются электронные линзы для фокусировки электронного пучка в пятно малых размеров. Это пятно постоянно обегает определенный участок образца (см. рис. 7).

У растрового микроскопа используется высокоинтенсивный источник электронов (1). Для чего около поверхности заостренной вольфрамовой проволоки малого диаметра создается сильное электрическое поле, освобождающее из нее электроны без нагрева. Такой источник почти в 10 тыс. ярче, чем источник с нагреваемой вольфрамовой проволокой.

Электроны с помощью ускоряющей системы (2) дополнительно ускоряются и фокусируются в пятно очень малого диаметра магнитной линзой (3). С помощью отклоняющих магнитных катушек (4) электронный пучок обегает весь участок образца (5). Детектор отраженных электронов (6), расположенный выше образца, регистрирует эти отраженные электроны.

Образующийся контраст связан в большей степени с углом падения электронов на образец, и при этом на изображении хорошо видна поверхностная структура (при сканирующей микроскопии).

Детекторы, которые расположены под образцом, используются для растровой просвечивающей микроскопии для изучения тонких образцов. Кольцевым детектором (7) регистрируются электроны, рассеянные на углы в несколько градусов.

Электроны, которые не претерпели рассеяния в образце, а также электроны, замедлившиеся при взаимодействии с образцом, проходят в отверстие кольцевого детектора.

С помощью энергетического анализатора (8), который расположен под кольцевым детектором, можно измерить энергию, утерянную электронами при рассеянии, и, соответственно, получить нужную информацию об исследуемом образце.



Рисунок 6. Электронный микроскоп
[URL: <https://ugra.ru/mikroskop/mikroskop-elektronniy.html>
(дата обращения: 07.06.2024)].

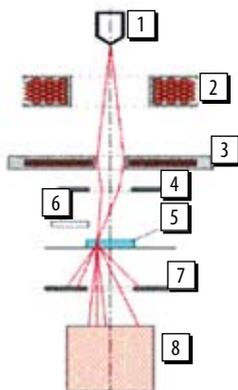


Рисунок 7. Ход лучей в растровом электронном микроскопе:
1 — высокоинтенсивный источник электронов; 2 — ускоряющая система; 3 — магнитная линза; 4 — отклоняющие магнитные катушки; 5 — образец; 6 — детектор отраженных электронов; 7 — кольцевой детектор; 8 — энергетический анализатор
[Микробиологический практикум, 2010].

Выделяется особый вид микроскопов — *стереомикроскопы*, которые являются аналогами человеческих глаз, так как в них имеется два объектива (рис. 8).



Рисунок 8. Стереомикроскоп

[URL: https://planetarium.ru/product/mikroskop-mikromed-stereo-ms-5—zoom-led/?utm_source=ymclid&ymclid=16362613441515262923200005 (дата обращения: 07.06.2024)].

Поляризационный микроскоп (рис. 9) имеет поляризатор, поляризующий свет лишь в одном направлении напряжённости. Такой свет позволяет исследователям увидеть исключительные явления, но не увидеть объект целиком, так как видны лишь блики, характеризующие часть объекта, например, поверхность объекта.



Рисунок 9. Поляризационный микроскоп [Фролов, С. В., 2015].

2.3. Основное общелабораторное оборудование

БОКС МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Обязательным для всех микробиологических лабораторий является наличие бокса микробиологической безопасности, который используется для защиты продукта за счет создания беспылевой стерильной воздушной среды в рабочей зоне.

Бокс используется для посева и пересева микроорганизмов в условиях стерильности. В боксе происходит удаления пыли и других микроскопических частиц. Устройство обеспечивает вертикальный или горизонтальный поток воздуха, и имеет вид шкафа, оборудованного лампами освещения, ультрафиолетовыми лампами и вмонтированной системой для подачи стерильного воздуха (рис. 11).



Рисунок 11. Бокс микробиологической безопасности 1 класса
[URL: <https://профлаб.рф/catalog/Laminarselter/bavnp-01-laminars-vis-a-vis-1-8/> (дата обращения: 07.07.2024)].

В любых случаях, когда необходима защита оператора и окружающей среды от потенциально опасных и опасных микроорганизмов или работа с объектами нуждается в стерильной рабочей зоне, используют боксы микробиологической безопасности (БМБ), которые предназначаются для создания беспылевой стерильной воздушной среды. Требования к БМБ регламентируются ГОСТ Р ЕН 12469–2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности». В данном документе определяется конструкция БМБ, состав, периодичность и методики проверок их эксплуатационных характеристик.

Боксы микробиологической безопасности делятся на три класса:

— БМБ I класса имеют рабочий проем, через который сотрудник может осуществлять действия внутри бокса (рис. 11). Бокс обеспечивает защиту сотрудников от выбросов диспергированной контаминированной массы частиц, образовавшихся внутри. Этого можно достигнуть за счет удаления контаминации, созданной в боксе, при помощи входящего потока воздуха через окно сотрудника со следующей его эффективной фильтрацией. БМБ I класса используют при исследовании непатогенных и условно патогенных микроорганизмов.

— БМБ II класса также имеют рабочий проем, через который сотрудник может осуществлять действия внутри бокса (рис. 12). Бокс сконструирован так, чтобы сотрудник был защищен и риск загрязнения продукта или перекрестного загрязнения очень низок, а удаление возникших загрязнений обеспечивается с помощью фильтруемого потока воздуха, циркулирующего внутри бокса, либо с помощью очищения воздуха, удаляемого из бокса. В отличие от бокса I класса, потоки воздуха в этих боксах напрямую не входят в рабочую зону, а уходят в воздухозаборники, где и очищаются специальными фильтрами, а затем уже — очищенные — перемещаются в рабочую камеру.

— БМБ III класса (рис. 13) имеют полностью изолированную рабочую зону, а сотрудник полностью отделен физическими барьерами от рабочего места (механически соединенные с боксом перчатки). Фильтрованные потоки воздуха постоянно поступают в бокс, а удаляемые наружу потоки фильтруются для предотвращения проникновения микроорганизмов во внешнюю среду (рис. 28).



Рисунок 12. Бокс микробиологической безопасности II класса
[URL: <https://www.amedisin.ru/catalog/laminarnye-boksy-i-boksy-biologicheskoy-mikrobiologicheskoy-bezopasnosti/>
(дата обращения: 07.07.2024)].



Рисунок 13. Бокс микробиологической безопасности III класса
[URL: <https://www.amedisin.ru/catalog/laminarnye-boksy-i-boksy-biologicheskoy-mikrobiologicheskoy-bezopasnosti/boksy-biologicheskoy-mikrobiologicheskoy-bezopasnosti/boks-biologicheskoy-mikrobiologicheskoy-bezopasnosti-bmb-iii-laminar-s-1-2-protect-vis-a-vis/> (дата обращения: 07.07.2024)].

Комнаты, где находятся боксы, регулярно обрабатываются. Ежедневно перед началом работ полы моют дезинфицирующими средствами (обычно 2–5%-й раствор хлорамина); воздух обрабатывается бактерицидными лампами, установленными на высоте 2–2,5 м от уровня пола. Количество ламп зависит от объема комнат — одна лампа (1,5–2,5 Вт) устанавливается на 1 м³ помещения. Обеззараживание помещений происходит в течение 2–3 часов перед началом работы в лаборатории. Если бактерицидные лампы отсутствуют, то непосредственно перед началом работ производится дезинфекция бокса, обработкой помещения хлорамином (5% раствор). Не менее чем один раз в неделю все помещение, содержащее боксы, необходимо мыть горячей водой с мылом, а затем дезинфицирующими средствами, после чего протирать досуха.

Для предотвращения заноса инфекционных микроорганизмов в бокс все образцы материалов, подлежащих исследованиям, вносятся в бокс только после тщательного предварительного протирания формалином (3% раствор). Все работы в боксе для соблюдения условий стерильности проводятся только в стерильных халатах, защитных масках и тапочках, специально предназначенных для бокса (рис. 14).



Рисунок 14. Работа в боксе

[URL: <https://spezlabor.ru/boksy-biologicheskoy-bezopasnosti.html>
(дата обращения: 07.07.2024)].

Воздух в боксе необходимо регулярно (не менее двух раз в неделю) проверять на бактериальную обсемененность в соответствии с МУ 3.3.2.056–96, МУК-4.2.734–99.

ДИСТИЛЛЯТОР

Дистиллятор (рис. 15) — прибор, предназначенный для получения дистиллированной воды, которая используется в лаборатории при приготовлении растворов, суспензий, необходима для разбавления реактивов. Вода должна соответствовать требованиям СанПиН 2.1.4.2653–10.

Устройство состоит из камеры испарения с сепараторами, конденсатора; имеются два электронагревателя (ТЭНы), уравниватели, датчик-предохранитель ТЭНов от перегорания, основания и электрощита, с помощью которого происходит подача электроэнергии к ТЭНам и цепи управления датчика. В камере испарения вода, которая поступает из водопроводной системы, нагревается до температуры кипения, а образовавшийся пар проходит через сепараторы и конденсируется,

превращаясь при этом в дистиллированную воду. Все имеющиеся примеси и микроорганизмы, содержащиеся в водопроводной воде, оседают в испарителе, а потом удаляются из аппарата в канализацию. Дистиллированная вода вытекает через ниппель в водосборник. Готовый дистиллят бывает холодным или горячим (около 80°C), в зависимости от заданных условий.



Рисунок 15. Дистиллятор

[URL: https://аквадистиллятор.рф/аквадистиллятор/10l/аквадистиллятор-dje-10m?utm_source=yandex&utm_campaign=generic_dsa_poisk_68428625&utm_medium=срц&yclid=5215440262812193911&roistat=direct3_search_11477124616_Аквадистилляторы%20от%204000p&roistat_referrer=none&roistat_pos=premium_5 (дата обращения: 03.07.2024)].

ЦЕНТРИФУГА

Центрифуга (рис. 16) — прибор для разделения смеси неоднородного состава на составные части по различной плотности с использованием центробежной силы. Устройство используется для осаждения микроорганизмов или клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсий, суспензий). В основе принципа центрифугирования находится способ отделения крупных частиц с большой плотностью при низких скоростях. Чем выше скорость, тем интенсивнее процесс осаждения более мелких частиц.

В лабораториях применяются следующие центрифуги: общего назначения (вращение ротора 6000–8000 об/мин.), скоростная рефри-

жераторная центрифуга (18000–25000 об/мин) и ультрацентрифуга (75000–80000 об/мин).

Скоростная рефрижераторная центрифуга (рис. 17) — сложный напольный аппарат с мощным двигателем, холодильной и вакуумной установками. Такие центрифуги используют для разделения частиц липопротеидов, бактерий, вирусов, клеточных органелл (ядра, митохондрии, рибосомы), либо для разделения высокомолекулярных неорганических и органических полимеров при определенной температуре.

Ультрацентрифуги (рис. 18) бывают аналитические и препаративные. При помощи данных аппаратов проводят исследования седиментационных свойств макромолекул для определения их молекулярной массы или структуры, например для разделения нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов.

Центрифугирование исследуемых веществ проводят только в специальных пробирках или сосудах, которые входят в комплект роторов. Они изготовлены из определенных сортов высокопрочного стекла либо нержавеющей стали, либо из некоторых видов полимеров (полиэтилена, нитрата целлюлозы, поликарбоната и др.).

Для удобства использования центрифуги снабжены реостатом, который позволяет плавно включать прибор и регулировать скорость вращения. Обычно увеличивают или уменьшают обороты постепенно, так как при резком изменении скорости вращения центрифуги может произойти выливание содержимого из пробирок поломка центрифуги. Многие современные центрифуги снабжены часами с устройством для автоматического выключения ее по истечению заданного времени работы. Для центрифуг, имеющих большую массу ротора, требуются больше времени для остановки. У ряда центрифуг имеется автоматический тормоз, сокращающий время остановки после выключения.



Рисунок 16. Центрифуга общего назначения
[URL: <https://x-medica.ru/centrifuga-laboratornaya-sm-6mt>
(дата обращения: 03.07.2024)].



Рисунок 17. Скоростная рефрижераторная центрифуга
[URL: <http://www.optimum-lab.ru/product/centrifuga-cvn-20r-refrizheratornaja-nastolnaja/> (дата обращения: 03.07.2024)].



Рисунок 18. Ультрацентрифуга
[URL: <https://rus-medteh.ru/ultracentrifuga-napolnaya-optima-l-90k/> (дата обращения: 03.07.2024)].

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите назначение бокса микробиологической безопасности.
2. Опишите последовательность работы бокса микробиологической безопасности.
3. Какие существуют боксы микробиологической безопасности? В чем их отличие и для чего они используются?
4. Что такое дистиллятор? Опишите его строение.
5. Для чего в лаборатории используется центрифуга?
6. Опишите строение центрифуги.
7. Какие виды центрифуг бывают? Для чего они используются?

2.4. Нагревательное, охлаждающее и термостатирующее оборудование

Эта группа оборудования включает в себя приборы, предназначенные для следующих действий: нагревание, стерилизация, охлаждение, поддержание температуры, высушивание, озонирование, термостатирование или подогрев в процессе лабораторных исследований.

Сушильный шкаф (рис. 19) — это прибор, являющийся обязательным для каждой лаборатории, независимо от вида ее деятельности. Прибор используется для определения количества влаги или других жидкостей в веществе, а также для стерилизации или вакуумной сушки. В комплект оснащения прибора входят: нагреватель, прибор контроля температуры, терморегулятор, вентилятор. Количество влаги в исследуемом веществе определяют в виде разницы в первоначальных образцах и в сухих остатках. Шкафы могут различаться по размерам, материалу камеры, типу контроллера, температурным диапазонам, форме и комплектации. Температура нагрева сушильного шкафа колеблется от 200 до 350°C в зависимости от модификации. Существуют специализированные шкафы для конкретных целей, например для высушивания зерна.



Рисунок 19. Сушильный шкаф

[URL: <https://ekspert-c.ru/p281094810-shkaf-sushilnyj-snol.html>
(дата обращения 03.07.2024)].

Муфельная печь (рис. 20) — прибор, который способен поддерживать температуру 900–1300°C или выше, в зависимости от моделей и производителей. Различные модели имеют разные размеры, точность поддержания температуры, тип и материал камеры, возможности контроллера (наличие и особенности программного режима). Отдельные модификации могут иметь особые вытяжные устройства для удаления продуктов горения.



Рисунок 20. Муфельная печь
[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnyie-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Водяная баня (рис. 21) — устройство для нагревания и поддержания температуры в определенном объеме жидкости (теплоносителя). В качестве жидкости обычно выступает дистиллированная вода, поэтому и название прибора соответствующее — водяная баня.

Максимальная температура нагрева жидкостей в обычной водяной бане — 100°C. Однако сегодня существуют модели для проведения работ с более высокой температурой — до 200°C. В этом случае, в качестве теплоносителя применяется особая силиконовая жидкость.

Модели лабораторных водяных бань различают по объему и глубине ванны, по количеству рабочих мест, по температурному диапазону и точности поддержания температуры.



Рисунок 21. Водяная баня
[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnyie-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Нагревательная плита (рис. 22) — прибор для нагревания сред. В лаборатории могут быть как маломощные электроплитки, так и более современные и мощные нагревательные плиты.

Температура нагревания поверхности может достигать 350–400°C, а материал поверхности изготавливается из алюминиевого сплава или из стеклокерамики.



Рисунок 22. Нагревательная плита

[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Песчаная баня (рис. 23) — нагревательное устройство, где теплоносителем является песок. Это способствует равномерному прогреванию образцов как при пробоподготовке, так и при анализе.

В песчаной бане температура нагрева может достигать до 300–400°C. Как правило, песок не поставляется в комплекте с баней.

Самый простой вариант песчаной бани — это обычная электроплитка и помещенный сверху лоток с песком.



Рисунок 24. Песчаная баня

[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Колбонагреватель (рис. 25) — прибор для нагрева одной или нескольких круглодонных колб с определенным объемом. Существуют модели, дополненные магнитной мешалкой для одновременного нагрева и перемешивания содержимого, а также модели с погружными термодатчиками, которые контролируют температуру.



Рисунок 25. Колбонагреватель
[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].



Рисунок 26. Термостат жидкостный
[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikaciya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Термостат воздушный (рис. 27) — прибор, похожий на сушильный шкаф, но имеющий более высокую точность поддержания температуры в камере и низкие температурные границы (максимальная

температура в термостате — 60–100°C, тогда как в сушильном шкафу — 200–350°C). Термостат обычно снабжен дополнительной стеклянной дверью, благодаря которой можно наблюдать за объектами, не изменяя температурный режим.



Рисунок 27. Термостат воздушный

[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikacziya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

Криостат жидкостный (рис. 28) — прибор для охлаждения до очень низкой температуры (около -80°C). Охладителем является жидкость, устойчивая к действию низких температур. Криостаты обычно состоят из погружного блока для регулирования температуры и ванны, в которой постоянно перемешивается жидкость.



Рисунок 28. Криостат жидкостный

[URL: <https://labblog.ru/laboratorное-oborudovanie-klassifikacziya-osnovnye-kategorii> (дата обращения 03.07.2024)].

1. Для чего используется сушильный шкаф в лаборатории?
2. Что такое муфельная печь?
3. Для чего предназначена водяная баня?
4. Для чего в лаборатории используется нагревательная плита?
5. Что такое песчаная баня и для чего она предназначена?
6. Какие виды термостатов бывают и чем они отличаются?
7. Что такое криостат и как он устроен?

2.4. Оборудование для дезинфекции и стерилизации

ПРАВИЛА ЭКСПЛУАТАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ

Виды противомикробных воздействий на микроорганизмы

Основными противомикробными действиями, которые оказывают прямое разрушающее и уничтожающее воздействие на микроорганизмы, являются асептика, стерилизация, дезинфекция, антисептика и химиотерапия.

Асептика представляет собой ряд мероприятий, которые связаны со способами предупреждения внедрения микроорганизмов в рану. Асептика необходима для предохранения всего организма и особенно ран от контакта с окружающей зараженной микроорганизмами внешней средой. Асептика предусматривает способы уничтожения микробов на всех соприкасающихся с раной поверхностях различными методами (физическим, химическим, биологическим и механическим).

Основным принципом асептики является стерильность (отсутствие бактерий) на всём, что соприкасается непосредственно с раной. К методам асептики относятся стерилизация белья, медицинского инвентаря, перевязочных средств; обеззараживание рук хирурга; дезинфекция всех помещений. Основой асептики являются способы стерилизации и дезинфекции.

Дезинфекция — это ряд мер, которые направлены на ликвидацию конкретного вида патогенного или условно-патогенного микроорганизма в любых объектах внешней среды при помощи химических антисептиков, а также физических и биологических воздействий.

Стерилизация — способ, который обеспечивает уничтожение в стерилизуемом материале всех форм (вегетативной и споровой) как патогенных, так и непатогенных микробов.

Целью стерилизации является предотвращение заноса микробов в организм при любых медицинских воздействиях; организация и сохранение асептических и безмикробных (гнотобиотических) сред;

предотвращение любого обсеменения микробами используемых питательных сред, культуры клеток, реагентов при всех видах микробиологических исследований; предотвращение возможной биодеградации (микробиологического разрушения) любых материалов (диагностического, лекарственного, продовольственного и пр.).

Стерилизации подвергаются все медицинские инструменты и аппараты, диагностические и лекарственные средства, белье, шовные и перевязочные материалы, предметы ухода за больным, питательная среда, а также все виды лабораторной посуды.

Процесс стерилизации для всех объектов включают основные фазы: дезинфекцию; очистку; сборку; сортировку и размещение в стерилизатор; собственно процесс стерилизации; сушку; контроль за ходом стерилизации; хранение простерилизованных объектов.

Одним из самых часто используемых способов стерилизации является *автоклавирование*. Автоклав обладает сильным стерилизующим воздействием, которое обусловлено наличием насыщенного под давлением пара, который контактирует с более холодными материалами, что ведет к конденсации паров в воду и ведет к значительному выделению тепла, которое повышает температуру стерилизуемых материалов. В результате этого процесса обезвоживания материалов не происходит.

Автоклав (рис. 29) — прибор для стерилизации при помощи горячего пара под давлением, при температуре от +121°C. Используют для стерилизации посуды и инструментов, уничтожения микробов, иногда для обеззараживания отходов. Применяются приборы обычно и для стерилизации питательных сред в течение 20–30 минут под давлением от 0,5 до 1,0 МПа [7, 8].



Рисунок 29. Автоклав

[URL: <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/avtoklavy/avtoklavy-sterilizatory-parovye/avtoklav-vertikalnyy-85-l-temperatura-105-137-s-avtomaticheskij-3870-elv-d/> (дата обращения: 03.07.2024)].

Для обеспечения безопасности каждый автоклав вместе со всеми относящимися к нему устройствами, находящимися под давлением (манометры, вентили и пр.), должен быть помещен в достаточно прочную отдельную несгораемую кабину. Установка и подключение прибора происходит согласно ГОСТ Р МЭК 61010–2–041–99.

Температура и продолжительность стерилизации определяются качеством стерилизуемого материала и свойствами тех микроорганизмов, которыми он заражен.

Стерилизация металлических инструментов. Металлические инструменты (ножницы, скальпели, пинцеты и пр.) стерилизуют в 2%-м растворе гидрокарбоната натрия, который предупреждает появление ржавчины и потерю остроты. Лезвия скальпелей и ножниц перед погружением в раствор рекомендуется обертывать ватой.

Стерилизация бактериальных петель. Бактериальные петли, сделанные из платиновой или хромовой проволоки, стерилизуют в пламени спиртовой или газовой горелки. Такой способ стерилизации получил название прокалывания или фламбирования.

Петлю в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивания сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение, накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокalывание в целом занимает 5–7 с.

Стерилизация патогенных культур микробов. Пробирки и чашки, содержащие культуры микробов, ненужные для дальнейшей работы, складывают в металлический бак, пломбируют крышку и сдают на стерилизацию. Культуры патогенных микробов, вегетативные формы убивают в автоклаве в течение 30 минут при давлении 1 атм. Сдача баков для стерилизации в автоклавную производятся специально выделенным лицом под расписку. Режим стерилизации регистрируется в специальном журнале.

При уничтожении культур микробов I и II групп патогенности, а также материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями, отнесенными к этим группам, баки с отработанным материалом переносят на металлических подносах с высокими бортами в присутствии сопровождающего лица, допущенного к работе с заразным материалом.

Стерилизация паром под давлением. Стерилизацию паром под давлением производят в автоклаве. Автоклав состоит из двух котлов, вставленных один в другой, кожуха и крышки. Наружный котел называют водопаровой камерой, внутренний — стерилизационной камерой. В водопаровом котле происходит образование пара. Во внутренней котел помещают стерилизуемый материал. В верхней части

стерилизационного котла имеются небольшие отверстия, через которые проходит пар из водопаровой камеры. Крышка автоклава герметически привинчивается к кожуху.

Стерилизация кипячением. Стерилизацию кипячением производят в стерилизаторе. В стерилизатор наливают дистиллированную воду, так как водопроводная образует накипь (стеклянные предметы погружают в холодную, металлические предметы — в горячую воду с добавлением гидрокарбоната натрия). Стерилизуемые предметы кипятят на слабом огне 30–60 минут. Началом стерилизации считается момент закипания воды в стерилизаторе. По окончании кипячения инструменты берут стерильным пинцетом, который кипятят вместе с остальными предметами.

Стерилизация сухим жаром. Стерилизация сухим жаром производится в печи Пастера. Подготовленный к стерилизации материал кладут на полки так, чтобы он не соприкасался со стенками. Шкаф закрывают и после этого включают обогрев. Продолжительность стерилизации при температуре 150°C два часа, при 165°C — один час, при 180°C — 40 минут, при 200°C — 10–15 минут (при 170°C бумага и вата желтеют, а при более высокой температуре обугливаются). Началом стерилизации считается момент, когда температура в печи достигнет нужной величины. По окончании срока стерилизации печь выключают, но дверцы шкафа не открывают до полного охлаждения, так как холодный воздух, поступающий внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде.

Аппарат Коха применяют для стерилизации питательных сред, разрушающихся при температуре выше 100°C (рис. 30). Обработка стерилизуемого материала в аппарате Коха производится в течение трех дней по 30 минут ежедневно. В перерывах между стерилизацией среду помещают на двадцать четыре часа в термостат при 28–30°C.



Рисунок 30. Аппарат Коха [URL: <https://www.8a.ru/print/33980.php> (дата обращения: 03.07.2024)].

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ВОЗДУХА В ПОМЕЩЕНИЯХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

Для уничтожения микроорганизмов в воздухе применяются **бактерицидные облучатели**.

Бактерицидные облучатели бывают *открытого и закрытого (рециркуляторы) типа*.

Закрытые облучатели (рис. 31) имеют корпус, внутри которого находится УФ-облучатель, поэтому воздух обеззараживается внутри прибора, куда он попадает принудительно при помощи встроенного вентилятора. Эти приборы не имеют отрицательного влияния УФ-волн на живые организмы и используются в тех помещениях, где находятся люди. Дезинфекцию воздуха такими приборами можно проводить длительное время, после проведения процедуры не требуется проветривание помещений.

Облучатели открытого типа (рис. 32) не имеют прикрытия, что позволяет проводить дезинфекцию воздуха и всех поверхностей вокруг от лампы, и в связи с тем, что ультрафиолетовые волны могут распространяться беспрепятственно, нахождение людей, животных или растений в помещении, дезинфицируемым открытыми облучателями, запрещено. Такие облучатели бывают настенные и потолочные. После применения открытого облучателя необходимо обязательное проветривание помещений.



Рисунок 31. Бактерицидный облучатель закрытый
[URL: https://www.dobrota.ru/product/recirkulator-2-115-p-plastik-armed/?utm_source=market.yandex.ru&utm_term=41048&ymclid=16375866116556427081700008 (дата обращения: 03.07.2024)].



Рисунок 32. Бактерицидный облучатель открытый
[URL: https://www.domvelesa.ru/beauty/irradiator/20769/?utm_source=yamarket&utm_term=20769&ymclid=16375863349811152200700004 (дата обращения: 03.07.2024)].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФИЛЬТРЫ

Бактериальный фильтр — устройство, используемое для задержки клеток бактерий и отделения их от жидкости при фильтровании микробной взвеси. Фильтрование через бактериальные фильтры происходит при положительном или отрицательном (вакуум) давлении. Основной составляющей бактериального фильтра является фильтрующая поверхность. Бактериальные фильтры в зависимости от их состава разделяются на керамические (свечи Шамберлана и Беркефельда), стеклянные (свечи или воронки Бюхнера (рис. 33) с впаянными пластинками из мелкопористого стекла, используются для фильтрации под давлением), асбестовые (фильтры Зейтца) и мембранные (коллоидные, миллипоровые).



Рисунок 33. Воронка Бюхнера
[URL: https://бмэ.орг/index.php/БАКТЕРИАЛЬНЫЕ_ФИЛЬТРЫ (дата обращения: 03.07.2024)].



Рисунок 34. Свечи Шамберлана

[URL: <https://www.mobetize.com/Replacement-Water-Filters/dndhti-153226/ImpregnatedCharcoal-BERKEY-Style-Replacement-Ceramic.action> (дата обращения: 03.07.2024)].

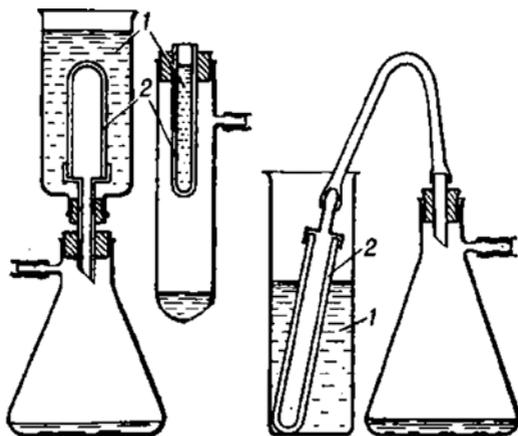


Рисунок 35. Схема монтажа фильтровальных свечей: слева — свечи Шамберлана; справа — свечи Беркефельда. 1 — фильтруемая жидкость; 2 — фильтровальная свеча [URL: https://бмэ.org/index.php/БАКТЕРИАЛЬНЫЕ_ФИЛЬТРЫ (дата обращения: 03.07.2024)].

Свечи Беркефельда изготавливаются из инфузорной земли и различаются по пористости. Пористость у свечей Беркефельда обозначается буквами: V (крупнопористая, 8–12 мкм), N (нормальная по-

ристость, 5–7 мкм) и W (мелкопористая, 3–4 мкм). Установка свечи Беркефельда показана на рис. 7.

Фильтры Зейтца (рис. 36) состоят из фильтровального аппарата различной емкости, выполненного из нержавеющей стали или сплавов и встроенных в него фильтровальных пластин толщиной 4–6 мм, сделанных из смеси асбеста и клетчатки.

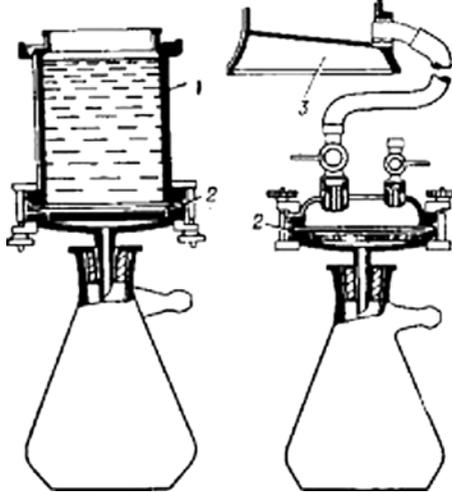


Рисунок 36. Смонтированный фильтр Зейтца
[URL: https://бмэ.орг/index.php/БАКТЕРИАЛЬНЫЕ_ФИЛЬТРЫ
(дата обращения: 03.07.2024)].

Контрольные вопросы и задания

1. Какие бывают виды противомикробных воздействий на микроорганизмы?
2. Что такое автоклав и для чего он предназначен?
3. Как необходимо готовить лабораторную посуду к стерилизации в автоклаве?
4. Как производится стерилизация металлических инструментов и бактериальных петель?
5. Как производится стерилизация патогенных культур микробов?
6. Что такое аппарат Коха и для чего он применяется?
7. Какие приборы применяются для уничтожения микроорганизмов в воздухе микробиологических лабораторий?
8. Что такое бактериальные фильтры и для чего они используются?
9. Что такое свечи Шамберлана? Какие виды свечей бывают?

2.5. Вспомогательное оборудование

Анаэростат — прибор для культивирования некоторых микроорганизмов, которым необходимы анаэробные или микроаэрофильные условия (рис. 37). В анаэростатах, использующих химические методы откачки воздуха, применяются **газогенерирующие пакеты «АНАЭРО-ГАЗ»** (для создания бескислородной и обогащенной углекислым газом искусственной атмосферы, являющейся оптимальной для культивирования облигатно анаэробов, таких как *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Petrostreptococcus*) и **«КАМПИЛОГАЗ»** (для создания искусственной атмосферы обедненной кислородом и обогащенной углекислым газом, которая является оптимальной для культивирования микроаэрофильных бактерий родов *Neisseria*, *Campilobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Streptococcus*).



Рисунок 37. Анаэростат

[URL: <https://labinstruments.ru/equipment-anaerostaty/3380502>
(дата обращения: 03.07.2024)].

Счетчик колоний (рис. 38) необходим для эффективного и быстрого подсчета числа колоний микроорганизмов, выросших на чашках Петри. Счетчик колоний используется для ручного, полуавтоматического счета колоний бактериальных или эукариотических клеток.



Рисунок 38. Счетчик колоний микроорганизмов
[URL: <https://biolight.ru/product/0025889>
(дата обращения: 03.07.2024)].

Аспиратор (проботборник) (рис. 39) — прибор, предназначенный преимущественно для контроля качества воздуха и для изучения состава воздуха или газов промышленных выбросов. Прибор используется для определения содержания в воздухе вредных веществ, примесей, пыли, влаги. В основе принципа работы прибора находится пропуск определенного объема воздуха через фильтр, который затем осаждается на чашку Петри.



Рисунок 39. Аспиратор
[URL: <https://deal.by/p69212602-vysokoeffektivnyj-mikrobiologicheskij-probootbornik.html> (дата обращения: 03.07.2024)].

Весы лабораторные используют для взвешивания питательных сред, образцов проб, аналитических фильтров (при бактериологическом анализе воздуха), реактивов и т. д. Обычно в лаборатории необходимо иметь два вида весов: электронные (рис. 40) и аналитические (рис. 41). Аналитические весы используются для более точного взвешивания небольшого количества реактивов.



Рисунок 40. Весы электронные лабораторные
[URL: https://posudaideal.ru/vesi_elektronnie_laboratornie_mwp___1500_1_5kg_91929872.html?ymclid=16387991445654958777500008 (дата обращения: 03.07.2024)].



Рисунок 41. Весы аналитические лабораторные
[URL: <https://magazin-vesov.ru/product/analiticheskie-vesy-aczet-sy-224c> (дата обращения: 03.07.2024)].

Для измерения уровня pH приготовленной питательной среды или непосредственно проб применяется **pH-метр**.

Существуют разнообразные модели таких приборов, однако нужно учитывать, что для лабораторных исследований подойдет прибор, имеющий точность измерения не ниже $\pm 0,1$ pH (рис. 42). Лабораторные pH-метры предназначены для измерения активности ионов водорода (pH), а также окислительно-восстановительного потенциала (Eh).



Рисунок 42. pH-метр.

Условные обозначения: 1 — ЖК-дисплей для вывода информации, 2 — корпус, 3 — клавиатура, 4 — комбинированный pH-электрод, 5 — термодатчик

[URL: https://www.piterlab.ru/goods/192500125-rn_metr_expert_rn_mikro (дата обращения: 03.07.2024)].

Холодильник в лаборатории необходим для хранения различных культур микроорганизмов, питательных сред, реактивов, проб образцов и пр., в течение времени, требуемого согласно нормативным документам.

В отдельных случаях, может потребоваться морозильная камера, с температурой от -18°C и ниже, поэтому обычно в лабораториях устанавливаются холодильники комбинированные, лабораторные, двухкамерные, с морозильной камерой (рис. 43), имеющие металлические двери. Такие холодильники обеспечивают хранение препаратов при температуре от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+14^{\circ}\text{C}$ в холодильной камере и при температурах от -10°C до -25°C — в морозильной камере.



Рисунок 43. Холодильник для микробиологической лаборатории [URL: <https://altyn-nsk.ru/p232158458-holodilnik-meditsinskij-340.html> (дата обращения: 03.07.2024)].

CO₂-инкубаторы (рис. 44) используются для поддержания заданной температуры и влажности в газовой среде, для предотвращения контаминации микроорганизмов.



Рисунок 44. CO₂-инкубатор [URL: <https://dv-expert.org/laboratornoe-oborudovanie/inkubator/memmert/co2-inkubatory-ico-memmert> (дата обращения: 03.07.2024)].

Микробиологический анализатор БакТрак 4300 автоматически регистрирует рост широкого спектра микроорганизмов (рис. 45). Анализатор имеет встроенное программное обеспечение, используемое для задания программы измерений, проведения измерений, просмотра результатов измерений, изменения настроечных параметров, просмотра памяти данных и т.д. Образцы в особых пробирках помещаются в блок. Прибор имеет простую подготовку образцов к исследованию и позволяет значительно увеличить число проводимых анализов в лаборатории. Компьютерная программа анализатора работает под операционной системой Windows. Программа позволяет решать широкий спектр задач в современной микробиологической лаборатории.

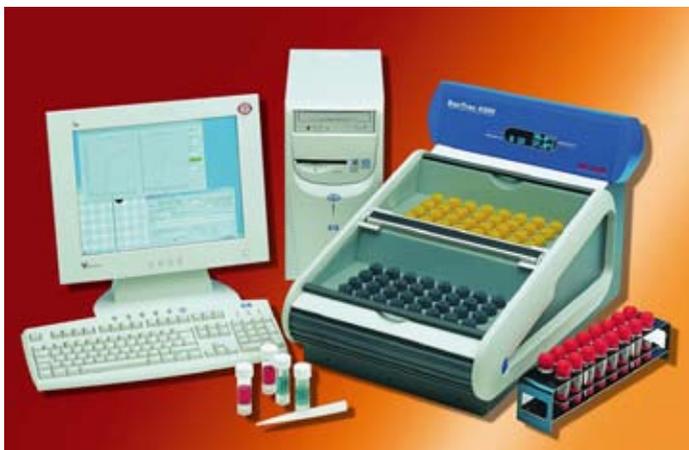


Рисунок 45. Микробиологический анализатор БакТрак-4300
[URL: https://econix.com/catalog/mikrobiologicheskie_analizatory_sy-lab-418/mikrobiologicheskiy_ekspress-analizator_baktrak_4300_na_64_obrazca_sy-lab-12932 (дата обращения: 03.07.2024)].

Рефрактометр (рис. 46) используется для определения содержания сухого вещества, сахара, спирта, аминокислот, витаминов, экстрактивных веществ по показателю преломления. Шкала указывает на индекс преломления для непосредственного измерения процентного содержания сухих веществ в растворах по сахарной шкале (%Brix, сахариметр). Рефрактометры применяются в микробиологических лабораториях для контроля концентрации веществ, определения белка в биологических жидкостях, измерения плотности растворов.



Рисунок 46. Рефрактометр

[URL: https://www.wikipir.ru/goods/92915686-refraktometr_ar_4_kruss (дата обращения: 03.07.2024)].

Фотоэлектроколориметры (рис. 47) применяются для измерения оптической плотности и коэффициентов пропускания окрашенных и коллоидных растворов. Этот оптический прибор позволяет измерять концентрации веществ в растворах. Действие колориметра основано на свойстве окрашенного раствора поглощать проходящий через них свет тем сильнее, чем выше в них концентрация окрашивающего вещества. В отличие от спектрофотометра, измерения идут в луче не монохроматического, а полихроматического узкоспектрального света, который формируется светофильтром. Применение различных светофильтров с узкими спектральными диапазонами пропускаемого света позволяет определять по отдельности концентрации разных компонентов одного и того же раствора. Фотоколориметры просты в использовании, недороги и обеспечивают точность, достаточную для большинства применений. Колориметр позволяет оценивать по степени мутности раствора концентрацию клеток микроорганизмов.



Рисунок 47. Фотоэлектроколориметр

[URL: <https://progresmed.ru/p279115464-fotokolorimetr-kfk-fotoelektricheskij.html> (дата обращения: 03.07.2024)].

2.6. Оборудование, используемое для перемешивания и разделения

К данной группе оборудования относят устройства для перемешивания, встряхивания или разделения на фракции. В некоторых типах моделей образцы могут дополнительно нагреваться либо охлаждаться.

Вортекс лабораторный (рис. 48) — перемешивающие приборы, осуществляющие циркуляционное и вибрационное движение с заданным временным диапазоном для разного типа пробирок и максимальным объемом перемешивания.



Рисунок 48. Вортекс лабораторный [URL: <https://ecotestery.ru/p244207575-tsentrifuga-mini-vorteks.html>] (дата обращения: 03.07.2024)].

Магнитная мешалка или магнитный смеситель (рис. 49) предназначена для быстрого и равномерного перемешивания жидкостей, с использованием вращающегося магнитного поля, при этом погруженная в жидкость мешалка (или блоха) очень быстро вращается, что и приводит жидкость в движение.



Рисунок 49. Магнитная мешалка или магнитный смеситель [URL: https://www.metrologia66.ru/goods/112029987-magnitnaya_meshalka_pe_6600_mnogomestnaya] (дата обращения: 03.07.2024)].

Ротатор (рис. 50) — это специальное устройство, которое предназначено для равномерного и разнонаправленного перемешивания различных растворов, жидкостей или других материалов. Этот прибор обеспечивает однородность приготовляемых смесей, нужную концентрацию для разных веществ и поддержание её в процессе работы.



Рисунок 50. Ротатор
[URL: https://www.tkuralrus.ru/goods/125292607-us_1071_rotator
(дата обращения: 03.07.2024)].

Шейкер лабораторный (встряхиватель) (рис. 51) — прибор, предназначенный для длительного перемешивания различных жидких веществ в сосудах (стаканы, колбы) в течение длительного времени за счет встряхивания. В процессе перемешивания происходит круговое движение особой платформы шейкера, на которой и крепятся емкости.

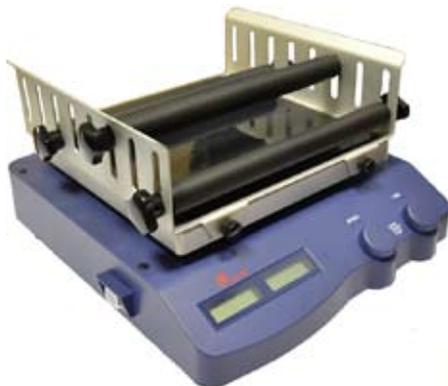


Рисунок 51. Шейкер лабораторный
[URL: <https://ae61.ru/p421295507-1350o-shejker-laboratornyj.html>
(дата обращения: 03.07.2024)].

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое анаэроустат и для чего он используется?
2. Каково предназначение счетчика колоний?
3. Для чего используются аспираторы?
4. Какие бывают виды лабораторных весов и для чего они используются?
5. Для чего применяются рН-метры?
6. Для чего в лабораториях необходимы холодильники?
7. Что такое CO₂-инкубаторы и для чего они необходимы?
8. Что такое рефрактометр и для чего он используется?
9. Для чего применяются фотоэлектроколориметры?
10. Какие устройства используются в лабораториях для перемешивания?

2.7. Лабораторная посуда для микробиологической лаборатории

В микробиологических лабораториях для взятия и транспортировки биологических материалов, для хранения реактивов и проведения исследований используется самая разнообразная посуда. Лабораторная посуда обычно изготавливается из стекла, фарфора или разных полимерных материалов. В настоящее время вместо обычной стеклянной посуды всё чаще применяется пластиковая посуда промышленного изготовления, которая поставляется обычно в индивидуальной упаковке, используется однократно и не требует подготовки. Ниже приведены основные виды посуды по ГОСТ 23932–90 и ГОСТ 4.321–85.

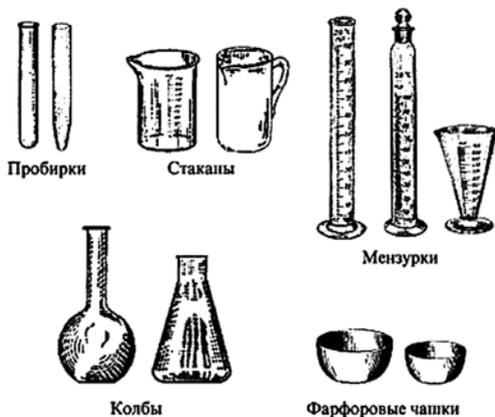


Рисунок 52. Микробиологическая посуда [Микробиология: практикум, 2018].

Микробиологические пробирки и колбы (рис. 52) используются для хранения жидкой и плотной питательной среды и для культивирования микроорганизмов.

Стаканы и мензурки (рис. 52) могут применяться в качестве мерной посуды и для разведения жидкостей.

Фарфоровые чашки используются для выпаривания или нагревания жидкости.

Фарфоровые ступки с пестиком (рис. 53) применяются для измельчения твердых веществ.



Рисунок 53. Фарфоровая ступка с пестиком
[Микробиология: практикум, 2018].

Для того чтобы предохранить питательные среды от попадания из воздуха посторонних микроорганизмов, все пробирки и колбы закрывают *ватными пробками*.



Рисунок 54. Приготовление ватной пробки
[Микробиология: практикум, 2018].

Бродильная трубка (рис. 55) используется для определения активности микроорганизмов по особенностям их газообразования. Выделяющийся при брожении газ вытесняет из запаянного конца жидкость. Объем выделившегося газа определяется по шкале, имеющейся на запаянном конце.

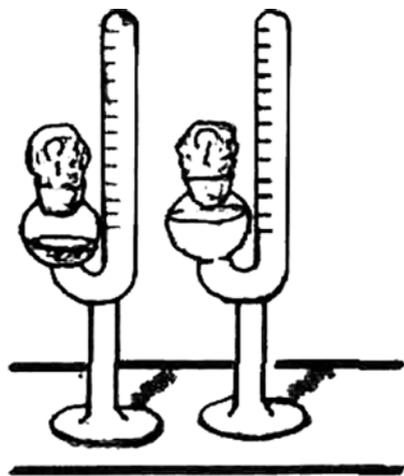


Рисунок 55. Бродильные трубки
[Микробиология: практикум, 2018].

Чашки Петри (рис. 56) применяются для выращивания культуры микроорганизмов на плотной питательной среде.



Рисунок 56. Чашки Петри: 1 — верхняя крышка;
2 — нижняя крышка [Микробиология: практикум, 2018].

При пересеве микроорганизмов из одной среды в другую используют *микробиологические петли* (рис. 57 а), сделанные из вольфрамовой проволоки и укрепленные в стеклянном или металлическом держателе; *иглы* (рис. 57 б) и *штапель* (рис. 57 в), которые используются для размазывания жидкой культуры на поверхности плотных питательных сред. *Пипетки Пастера* (рис. 57 г) применяются для пересева жидкой культуры микроорганизмов.

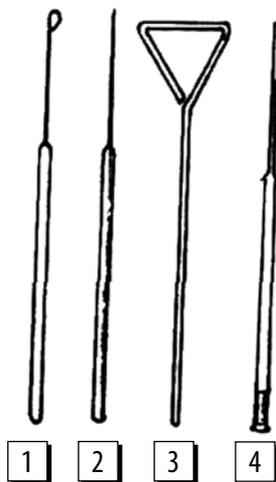


Рисунок 57. Микробиологический инструмент:
 1 — микробиологическая петля; 2 — игла; 3 — штапель;
 4 — пипетка Пастера [Микробиология: практикум, 2018].

Пипетки (рис. 58) используются для отбора точно определенного и относительно небольшого объема жидкости. Они имеют вид градуированных стеклянных трубок небольшого диаметра. Нижний конец пипетки имеет внутренний диаметр около 1 мм и слегка оттянут, а на верхнем конце имеется метка, до которой нужно набирать жидкость. Некоторые пипетки имеют две метки. Обычно выпускаются пипетки емкостью 1–100 мл.



Рисунок 58. Пипетка [Микробиология: практикум, 2018].

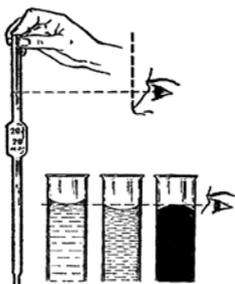


Рисунок 59. Определение объема жидкости по мениску [Микробиология: практикум, 2018].

В связи с тем, что при проведении исследований необходимо точно и быстро дозировать пробы и реагенты, часто используются механические дозаторы переменного объема для дозирования жидкостей объемом от 0,1 мкл до 10 мл (см. рис. 60).



Рисунок 60. Дозаторы пипеточные

[URL: <https://paneco-ltd.ru/products/dozator-mehanicheskij-1-kanalnij-tehno-f1-0-5-5-ml>. (дата обращения: 03.07.2024)].

Шпатели и микробиологические петли перед посевом и после его окончания необходимо прокалить в средней части пламени спиртовки (рис. 64).

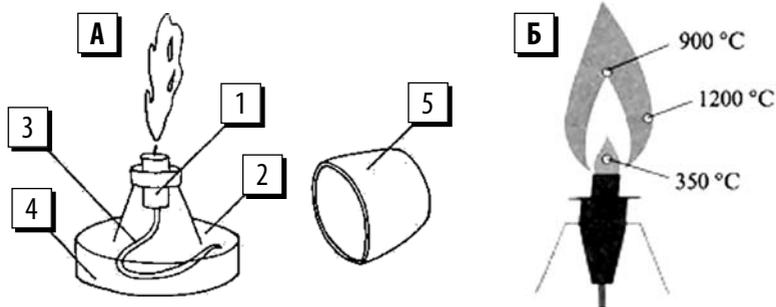


Рисунок 64. Спиртовка (А) и температура ее пламени (Б).

Условные обозначения: 1 — трубка с диском; 2 — резервуар;

3 — фитиль; 4 — спирт; 5 — колпачок

[Микробиология: практикум, 2018].

Контрольные вопросы

-
1. Опишите основные виды посуды.
 2. Для чего предназначены фарфоровые ступки и как с ними правильно работать?
 3. Что такое бродильная трубка и для чего она предназначена?
 4. Какое оборудование (инструменты) используют при пересеве микроорганизмов из одной среды в другую?
 5. Для чего используются пипетки?

Задания для самостоятельной работы

-
1. Хромовая смесь. Значение, применение, этапы работы.
 2. Запишите последовательность действий при подготовке к использованию новой лабораторной посуды.
 3. Запишите последовательность действий подготовки к использованию лабораторной посуды, которая была в употреблении.
 4. Запишите последовательность действий подготовки предметных и покровных стекол.



Тема 3

Приготовление и способы окраски препаратов микроорганизмов разных видов

3.1. Основные правила приготовления микропрепаратов

При выполнении работы в микробиологической лаборатории, в том числе и при приготовлении микроскопических препаратов, необходимо придерживаться следующих основных условий:

— стерильность — одно из главных условий при работе в микробиологических лабораториях;

— на рабочем столе должно быть только необходимое для работы оборудование и материалы;

— для отбора исследуемого материала используют бактериологические петли, стерильные пипетки, пинцеты; инструменты, использованные при выполнении задач, необходимо прокалывать над пламенем огня газовой горелки (спиртовки) или поместить в специальный дезинфицирующий раствор; горловины пробирок и колб необходимо обжигать в пламени огня спиртовки до и после окончания работы;

— всю работу по отбору материала и приготовления препарата следует проводить над пламенем спиртовки в условиях бокса для исключения загрязнения материала и микробиологической лаборатории; обязательно соблюдение мер безопасности при работе со спиртовкой. Перед началом всех работ в лаборатории бокс подвергают обработке ультрафиолетовым излучением. Длительность обработки — 15–30 минут. Также проводят обработку поверхностей. Для этого используют 70%-й раствор этилового спирта. Также необходимо мыть и обрабатывать ламинарный бокс изнутри;

— перед приготовлением микропрепаратов предметные и покровные стекла хорошо промывают, сушат, стерилизуют (обеззараживают), обезжиривают;

— при приготовлении мазка из исследуемого материала, который содержит микроорганизмы, материал фиксируют термическим или физическим способом;

— при попадании исследуемого микробного материала на кожу рук, лица, наружную слизистую оболочку глаз, носа или рта нужно принять меры к обеззараживанию;

— при загрязнении рабочего стола исследуемым микробиологическим материалом загрязненные места обрабатывают 70%-м этанолом или 3%-м водным раствором хлорамина;

— при приготовлении микропрепаратов не рекомендуется класть использованные бактериальные петли, пипетки, пробки от пробирок и колб на рабочий стол;

— лабораторное оборудование, материалы исследования выносить за пределы лаборатории запрещается;

— по окончании работы необходимо привести в порядок рабочий стол.

Оборудование для приготовления и изучения микропрепаратов:

— микроскоп;

— лабораторная посуда (разного рода пробирки, стерильные пипетки, чашки Петри, колбы);

— спиртовка; горелка;

— предметные и покровные стекла;

— бактериологические петли, пинцеты, шпатели;

— штатив для пробирок.

Также важной составляющей лабораторного материала для приготовления микробиологических препаратов являются: фильтровальная бумага, дистиллированная вода, бактериальные краски, физиологический раствор, культуры бактерий с питательными средами.

В качестве материала для исследования может выступать:

— кровь, гной, моча, испражнения (используют для прижизненной диагностики);

— фрагменты паренхиматозных органов (используют для посмертной диагностики);

— продукты животного и растительного происхождения (молочные продукты, мясо, яйца, сено и другие).

Последовательность отбора исследуемого материала и приготовления мазка показана на рисунке 65.

Общие правила отбора микробной культуры для приготовления препарата (мазка):

— правой рукой берут бактериологическую петлю и прокалывают над пламенем спиртовки;

— левой рукой берут пробирку с исследуемой микробной культурой, двумя оставшимися пальцами правой руки вынимают пробку (ни в коем случае пробку от пробирки не следует класть на рабочий стол);

— практически в то же время при извлечении пробки следует обжечь края пробирки;

— все манипуляции с пробиркой и бактериологической петлей необходимо проводить вблизи пламени спиртовки;

- бактериологическую петлю следует опустить в пробирку и охладить;
- бактериологической нужно взять необходимое количество исследуемой микробной культуры, и аккуратно, не задевая, извлечь петлю из пробирки;
- далее провести необходимые манипуляции на предметном стекле.

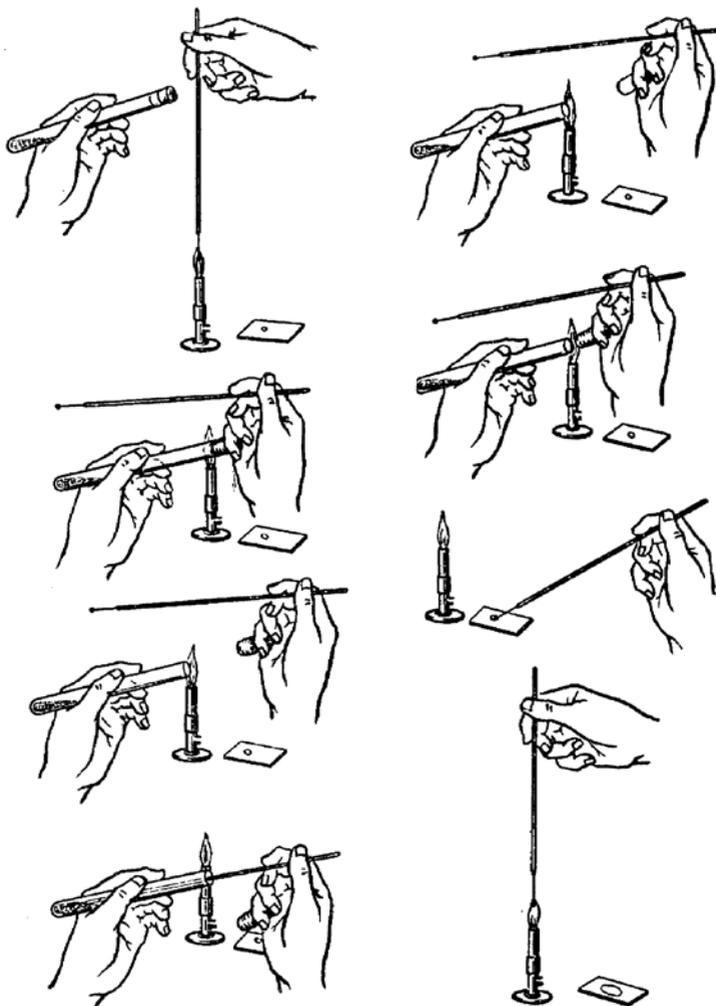


Рисунок 65. Последовательность работ при приготовлении мазка [Зюзина, О. В., 2015].

3.2. Виды микропрепаратов

Микроскопические микропрепараты — это разные объекты, подготовленные к микроскопированию с помощью различных методов и технологий.

Выделяют следующие виды микроскопических препаратов:

— *Постоянные препараты*. Постоянные микропрепараты могут храниться без потери своих свойств в течение многих лет. Для хранения постоянных препаратов создаются особые условия. Объекты (исследуемые культуры микроорганизмов) для микроскопирования проходят сложную подготовку, которая завершается тем, что препарат покрывают канадским бальзамом (или другим реактивом) (рис. 66).

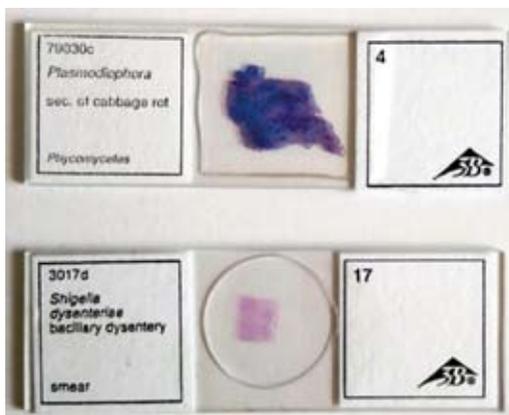


Рисунок 66. Внешний вид постоянных микропрепаратов (фотография Р. Ворошилина) [Микробиология: учебное пособие / составитель О.М. Соболева, 2018].

— *Временные препараты*. Такие микропрепараты характеризуются тем, что их невозможно хранить значительное долго время. После изучения микропрепарата объекты на предметном стекле обычно смываются. В зависимости от целей микроскопирования объектов, выделяют следующие группы временных микропрепаратов:

а) *витальные (прижизненные микропрепараты)*. Витальные препараты изготавливают для изучения микроорганизмов в живом виде. Особенно важны такие препараты при изучении подвижности клеток различных микроорганизмов. Различают следующие виды витальных микропрепаратов: «раздавленная капля» (рисунок 81), «висячая капля»;

б) *фиксированные микропрепараты (или убитые)*. При приготовлении таких микропрепаратов происходит прерывание жизненных процессов исследуемых объектов (микроорганизмов). Одной из разновидностью фиксированных микропрепаратов является мазок (рис. 67);

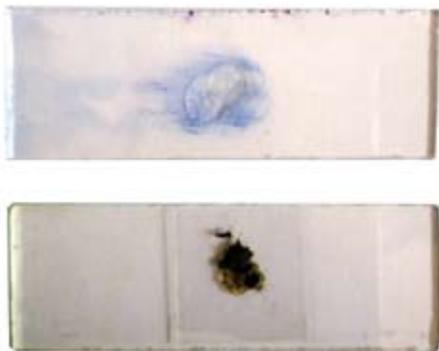


Рисунок 67. Внешний вид временных микропрепаратов: вверху — мазок, внизу — «раздавленная капля» (фотография Р. Ворошилина) [Микробиология: учебное пособие / составитель О.М. Соболева, 2018].

3.3. Препараты живых клеток

Микропрепарат «раздавленная капля». Особенность данного препарата состоит в том, что суспензия с наблюдаемыми микроорганизмами находится под покровным стеклом.

Микропрепарат «висячая капля». Данный препарат готовят с целью наблюдения за микроорганизмами, их делением и движением; еще одна особенность данного препарата заключается в том, что для его получения не используют покровное стекло, микробная культура находится в своих естественных условиях;

Микропрепарат «отпечаток». Изготавливается путем прикладывания предметного стекла к верхней части колонии (например, для исследования спороншения определенных микробов) или к ткани, продуктам питания, кожным покровам или слизистым.

Препарат «микрокультура». Препарат изготавливается методом выращивания микроорганизмов сразу на предметном стекле, предварительно покрытом агаризованной питательной средой. Такой препарат позволяет следить непосредственно за развитием колонии микроорганизмов, ее структурой и расположением клеток.

Наиболее распространенными являются микропрепараты «раздавленная капля» и «висячая капля». Они имеют сходные характеристики. Изготавливают такие микропрепараты для изучения подвижности микробных клеток, структуры, форм микробов.

Практические задания

1. Приготовление препарата «раздавленная капля»

Материалы и оборудование: микроскоп; спиртовка, спички; бактериальная петля или стерильная пипетка; покровное стекло; предметное стекло; фильтровальная бумага; источник микроорганизмов (могут быть молочные продукты, вода из водоемов и другие).

Порядок действий:

а) на обеззараженное стерильное предметное стекло наносят каплю воды;

б) в каплю воды на стекле вносят исследуемую культуру микробов, размешивают, а затем покрывают покровным стеклом; покровное стекло опускают на исследуемую культуру таким образом, чтобы не остались пузырьки воздуха, которые могут помешать дальнейшему микроскопированию. Если исследуемую культуру отбирают из пробирки, в целях стерилизации края пробирки обжигают в пламени спиртовки. Если для исследования необходима микробная культура из плотной (твердой) питательной среды, то для отбора материала используют обеззараженную бактериальную петлю. Если материал для исследования выращен в жидкой питательной среде, то для отбора используют стерильную пипетку (рис. 68). Изучать препарат под микроскопом нужно сразу же после изготовления, так как жидкость быстро испаряется.

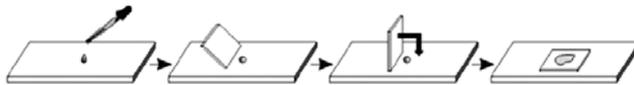


Рисунок 68. Приготовление препарата «раздавленная капля»
[Микробиология: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин, 2019].

Для суспензии, взятой из жидкой среды предварительно наносить каплю воды на предметное стекло не нужно.

в) излишки выступающей жидкости убирают фильтровальной бумагой.

г) приготовленный препарат «раздавленная капля» рассматривают под микроскопом без иммерсии.

Применение. Препарат позволяет изучить морфологию исследуемых микроорганизмов: формы, характер расположения; изучить споры и подвижность микробов.

2. Приготовление препарата «висячая капля»

Материалы и оборудование: для приготовления микропрепарата «висячая капля» необходимо покровное стекло с лункой.

Порядок действий:

а) маленькую каплю суспензии с микробной культурой вносят на заранее обезжиренное покровное стекло;

б) сверху покровное стекло с суспензией покрывают предметным стеклом с лункой (предметное стекло с лункой заранее растирают вазелином). Данную процедуру проводят таким образом, чтобы покровное стекло могло прилипнуть на предметное стекло с лункой;

в) получившийся препарат переворачивают, в результате образуется висячая капля в камере. Капля в камере не должна касаться ни дна лунки, ни стенки. В связи с тем, что жидкость испаряется медленно, наблюдение за микроорганизмами можно проводить значительное время (рис. 69).

Применение: изучение размножения микробов, их подвижности, образования спор, влияния химических раздражителей на микробы.



Рисунок 69. Приготовление препарата «висячая капля»

[Микробиология: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин, 2019].

3. Приготовление микропрепарата «отпечаток»

Порядок действий:

а) из чашки Петри с питательной средой вырезают небольшой кубик с микробной культурой, которая растет в виде одиночной колонии. Для вырезания используют стерильный скальпель. Этот «кубик» переносят на предметное стекло таким образом, чтобы поверхность микроорганизмами была обращена вверх.

в) сверху колонии прикладывают покровное стекло, осторожно надавливают, а затем аккуратно снимают, чтобы колония микробной культуры не сдвинулась с места; результат — образовался препарат с отпечатком исследуемой культуры.

г) предварительно заранее заготавливают предметное стекло с каплей воды. Вместо воды можно использовать метиленовый синий.

д) препарат с отпечатком вниз накладывают на подготовленное предметное стекло.

е) полученный микропрепарат рассматривают под микроскопом.

Пояснения: вместо покровного стекла также можно использовать предметное стекло. Нужно коснуться предметным стеклом исследуемого материала, а дальше аналогично. Также эти отпечатки можно окрашивать красителями.

Применение: изготавливают микропрепараты для изучения положения клеток микроорганизмов, их спор.

4. Приготовление препарата «микрокультура»

Техника приготовления микропрепарата «микрокультура» включает следующие действия:

— предметное стекло обеззараживают. Для этого стекло несколько раз проводят перед пламенем спиртовки. Стерильной пипеткой, предварительно нагретой над пламенем спиртовки, вносят на предметное стекло 0,2–0,3 мл горячей агаризованной питательной среды;

— питательную среду размазывают, равномерно распределяя по поверхности предметного стекла; агару дают время застыть;

— затем с помощью стерильной петли устраняют лишний агар. На предметном стекле оставляют лишь два участка агара величиной с покровное стекло каждый;

— после в центр каждого участка агара с помощью бактериологической петли или стерильной пипетки вносят небольшую каплю жидкой исследуемой культуры или суспензии;

— предметное стекло с исследуемой культурой помещают во влажную камеру. Влажную камеру изготавливают из чашки Петри и намоченной водой фильтровальной бумаги;

— затем влажную камеру с содержимым помещают в термостат;

— перед рассмотрением препарата под микроскопом на агар с микрокультурой наносят небольшую каплю красителя или каплю воды (если пленка агара сильно подсохла). Затем сверху накрывают стерильным покровным стеклом и микроскопируют.

Микропрепарат «микрокультура» позволяет вести наблюдение за процессами роста, развития, размножения микроорганизмов, а также изучать влияние на эти процессы каких-либо агентов. Особенность таких препаратов состоит в том, что при их подготовке расположение клеток в растущей колонии не нарушается, а остается в естественном виде. Колонии микроорганизмов можно выращивать в аэробных и анаэробных условиях. При анаэробных условиях используют покровные стекла; для герметизации используют лак.

5. Приготовление препаратов фиксированных клеток

Особенность фиксированных микропрепаратов состоит в том, что их можно хранить и изучать значительное время. Примеры фиксированных микропрепаратов: препараты естественных источников микроорганизмов — пива, кефира, рассолов.

Применение фиксированных препаратов:

- используются микропрепараты для исследования морфологических признаков микроорганизмов;
- количественный учет микробов;
- проверка чистоты микробных культур.

Основные этапы изготовления фиксированных микропрепаратов:

- 1) получение мазка;
- 2) высушивание;
- 3) фиксация микропрепарата;
- 4) окрашивание красителями.

Все этапы приготовления фиксированного окрашенного микропрепарата представлены на рис. 70.

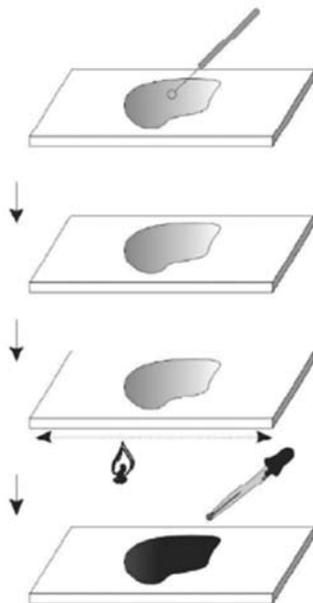


Рисунок 70. Этапы приготовления фиксированного окрашенного препарата
[Микробиология: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин].

Получение мазка. Сначала на обезжиренное стерильное предметное стекло наносят небольшую каплю воды. Затем микробиологической петлей вносят в каплю воды исследуемый микробный материал. Исследуемый материал хорошо размазывают на предметном стекле с помощью бактериальной петли или краем другого предметного стекла. Площадь мазка должна составлять 1–2 см². Преимущественно нужно сделать тонкий слой мазка, для ее быстрой сушки. После внесения исследуемой культуры с плотных питательных сред необходимо излишек материала на бактериологической петле сжечь в пламени спиртовки или горелки.

Высушивание. Данную процедуру проводят при комнатной температуре. Если процесс сушки протекает очень медленно, можно использовать горелку или спиртовку. Предметное стекло с мазком легкими движениями проводят высоко над спиртовкой. Перегреть микропрепарат нельзя.

Фиксация микропрепарата. Выделяют несколько способов фиксации микропрепаратов. Но наиболее известными являются:

- фиксация с помощью термической обработки;
- с помощью различных химических веществ.

Мазки фиксируют для:

- умерщвления микроорганизмов;
- прочного прикрепления клеток микроорганизмов к покровному стеклу;
- для лучшего окрашивания микроорганизмов, так как мертвые клетки намного восприимчивее к окраске.

При фиксации с помощью термической обработки микропрепарат трижды или четырежды раз проводят через самую горячую часть пламени. В качестве источника пламени используют спиртовку или газовую горелку.

Перегреть микропрепарат на этом этапе также нельзя, так как это может привести к структурным изменениям клеток микроорганизмов. Эта процедура очень важна, поскольку при плохой фиксации содержимое микропрепарата может легко смыться при проведении следующих манипуляций приготовления фиксированного микробиологического препарата. Для установления надежности фиксации микропрепарата предметное стекло прикладывают к тыльной стороне левой руки. При правильном проведении процедуры фиксации предметное стекло должно быть горячим, но не должно вызывать ощущение ожога.

Другой способ — фиксацию препарата с помощью различного рода химических веществ осуществляют для изучения тонкого строения клетки. Данный способ может осуществляться следующим образом:

— определенное химическое вещество наливают непосредственно на мазок;

— микробиологический препарат погружают в посуду с химическим веществом (фиксатор).

Чаще всего в качестве фиксаторов используют следующие химические вещества:

— этанол (фиксацию осуществляют в течение 15–20 минут);

— метанол (фиксацию осуществляют в течение 3–5 минут);

— смесь равных частей этанола и эфира (фиксацию осуществляют в течение 15–20 минут);

— ацетон (время фиксации — 5–7 минут).

После завершения процедуры фиксации препарат промывают водой. Химический метод фиксации считают мягким по действию. Этот метод рекомендуют использовать для микроскопических препаратов, сделанных из крови или паренхиматозных органов. Также этот метод благоприятен для препаратов, приготовленных из сметаны и сливочного масла.

Окрашивание. Для окрашивания препаратов применяют растворы красок или красящие бумаги. Красящей бумагой называют пропитанную краской фильтровальную бумагу.

Выделяют простые и сложные способы окрашивания микропрепаратов. Для окрашивания микроорганизмов чаще всего используют анилиновые красители. Бывают кислые и основные красители. Отличаются они тем, что у кислых красителей красящую способность определяет анион, а у основных — катион. К кислотным красителям относятся эозин, эритрозин, нигрозин, кислый фуксин. К основным красителям относятся: метиленовый синий, основной фуксин, генициановый фиолетовый, кристаллвиолет, сафранин.

Микропрепарат-«отпечаток» также может быть подвержен фиксации и окраске. Срок хранения фиксированных препаратов — до трех месяцев.

Техника окрашивания препаратов красящей бумагой включает следующие действия:

— перед окрашиванием микропрепарат хорошо фиксируют и высушивают;

— на подготовленный препарат вносят стерильной пипеткой несколько капель воды;

— затем сверху накладывают красящие бумажки. Размер бумажки — 2х2 см (величиной — в размер покровного стекла). Красящие бумажки должны оставаться влажными до окончания процесса окрашивания. При появлении признаков высыхания необходимо их смачивать водой. Длительность данной процедуры зависит от способа окраски;

— при истечении срока процедуры красящие бумажки аккуратно снимают обеззараженным пинцетом;

— затем препарат промывают водой и высушивают при комнатной температуре на воздухе. Можно для высушивания использовать фильтровальную бумагу.

Техника окрашивания фиксированного препарата растворами красителей включает следующие действия:

— перед окрашиванием фиксированный микропрепарат помещают на стеклянный мостик, лежащий на стеклянном (металлическом) кювете;

— стерильной пипеткой наносят краситель на мазок (необходимо убедиться, что краситель покрывает весь мазок). Длительность этой процедуры — 1–3 минуты. При попадании краски на окружающие предметы, ее можно удалить с помощью спирта.

— после окрашивания препарат промывают водой;

— остатки воды устраняют с помощью фильтровальной бумаги; для этого микропрепарат помещают между двумя обрезками фильтровальной бумаги.

Для простого способа окрашивания чаще всего используют следующие красители: фуксин, генициановый фиолетовый, метиленовый синий. На рисунке 71 показаны стрептококки, окрашенные красителем «метиленовый синий».

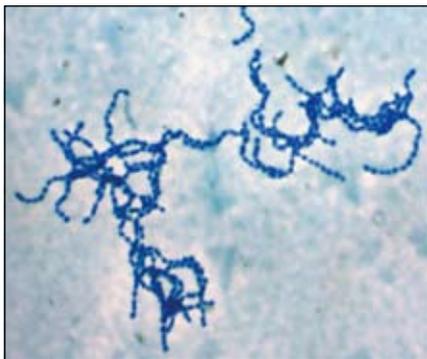


Рисунок 71. Стрептококки под микроскопом
(окраска метиленовым синим)

[Техника приготовления и окраски микропрепарата, 2020].

Готовые микропрепараты рассматривают под объективом 90×, предварительно капнув на мазок иммерсионного масла.

Простые способы окрашивания микропрепаратов применяют при изучении микроорганизмов, относящихся к одной определенной группе. Например, молочнокислые бактерии. Это связано с тем, что простые способы окрашивания не позволяют провести дифференцировку микробных клеток.

Сложное окрашивание микроорганизмов используют для дифференцированной окраски бактерий, отдельных структур и органоидов их клетки, различных включений цитоплазмы. По сравнению с простой окраской для сложной окраски характерно применение нескольких видов красителей. Также при сложном окрашивании используют разные методы фиксации и подготовки препарата. К сложным методам окраски препаратов относят: окраску по Граму, окраску эндоспор, окраску различных включений, некоторых групп патогенных микроорганизмов и др.

Контрольные вопросы

1. Опишите основные правила приготовления микропрепаратов.
2. Опишите общие правила отбора микробной культуры для приготовления препарата (мазка).
3. Чем отличаются постоянные и временные микропрепараты?
4. Какие препараты живых клеток известны?

3.4. Виды окрасок микропрепаратов

В связи с тем, что многие микроорганизмы в обычных условиях не окрашены, их очень трудно рассмотреть в световой микроскопии. Роберт Кох первым стал использовать методику окрашивания микроорганизмов для их изучения.

Выделяют следующие типы окраски микропрепаратов:

1. *Прижизненная окраска или витальная окраска.* Для такого типа окраски применяют витальные красители, которые не убивают клетки микроорганизмов. Примеры: водные растворы в концентрации 0,2–0,001% метиленового синего, конго красного.

2. *Окраска фиксированных препаратов.* На этапе фиксации мазка происходит гибель клеток микроорганизмов. Для такого типа окрашивания применяют разные виды красителей.

Также выделяют следующие виды окрасок микропрепаратов:

1. *Простая окраска.* Простую окраску осуществляют, применяя только один краситель. Процесс окраски протекает в одну стадию. Используют данный способ для определения наличия или отсутствия конкретных микроорганизмов в исследуемом материале; также этот метод окраски предназначен для изучения морфологических признаков бактерий.

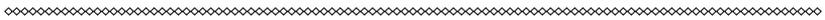
Обычно для простой окраски используют следующие виды красителей: раствор фуксина, щелочная метиленовая синь.

2. *Сложная окраска.* Сложная окраска характеризуется использованием двух или нескольких красителей. Примеры сложных окрашиваний микропрепаратов: окраска по Граму (применяют три красителя), окраска по Цилю — Нельсону (чаще всего используют в медицинской практике), окраска по Романовскому — Гимзе, окраска Ольта, окраска Михина.

Применение сложных методов окрашивания используют для определения наличия спор, капсул, включений микроорганизмов, а также для их изучения. Сложные методы окрашивания также применяют после процедуры фиксации препаратов. Сложные методы окраски препаратов основаны на том, что разные виды бактерий по-разному воспринимают окрашивание красками. И связано это с тем, что разные виды бактерий обладают неодинаковым химическим составом и клеточной стенкой.

3. *Дифференцированная окраска.* Применяют для окрашивания определенных частей микроорганизмов: капсул, нуклеоида, включений, жгутиков и др.

Практические задания



1. Простая окраска

Выполнение простой окраски препарата осуществляют после этапа фиксации (после промывки микропрепарата от фиксатора водой)

План действий при окрашивании:

1. После промывки мазка на препарате чистой водой от фиксатора на микропрепарат наливают некоторое количество красителя. Время окрашивания препарата зависит от вида красителя. Время окрашивания фуксином — 1–2 минуты; время окрашивания метиленовым синим — 3–5 минут. Во избежание загрязнения красителем иных объектов препарат для окрашивания помещают на край ванночки и всю процедуру окрашивания проводят на нем;

2. После процедуры окрашивания препарат необходимо промыть водой. Промывают микропрепарат до тех пор, пока стекающая вода не станет почти неокрашенной;

3. Сушат микропрепарат на воздухе; также препарат можно просушить фильтровальной бумагой.

4. По окончании сушки можно исследовать препарат с окрашенным мазком под микроскопом. Для этого используют микроскопы с иммерсионным объективом 90×. Предварительно, перед изучением, на препарат наносят небольшую каплю иммерсионного масла.

При правильном изготовлении и окрашивании в микропрепарате поле зрения остается неокрашенным, окрашиваются красителем только клетки микроорганизмов.

2. Выполнение окраски по Граму

Окраска по Граму. Датский ученый К. Грам в 1884 году описал специальный способ окраски клеток микроорганизмов с помощью красителя который состоит из основного красителя (генциановый фиолетовый) и йода (раствор Люголя), который потом обесцвечивают спиртом.

По характеру отношения бактерий к красителям выделяют следующие их типы:

- грамположительные бактерии (Грам +);
- грамотрицательные (Грам –).

Отличие этих типов бактерий состоит в следующем: грамположительные бактерии окрашиваются по Граму, то есть эти микроорганизмы образуют прочные соединения с фиолетовой краской (генциановый фиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллвиолет) и йодом. Данное соединение невозможно извлечь из микробов с помощью действия спирта. Грамотрицательные бактерии не окрашиваются по Граму. Эти бактерии образуют непрочные связи с фиолетовой краской, которые легко извлечь с помощью спирта. Как результат: грамотрицательные бактерии — бесцветные.

Для выделения грамотрицательных бактерий используют дополнительные красители, например раствор фуксина. В результате дополнительного окрашивания грамотрицательные бактерии окрашиваются в красный цвет.

Техника окрашивания микропрепаратов по Граму:

1. Сначала на обезжиренное стерильное предметное стекло наносят три мазка разных исследуемых культур (два из этих мазков являются контрольными: один — Грам +; второй — Грам –); для этого бактериологической петлей или стерильной пипеткой (если исследуемая культура выращена на жидкой питательной среде) вносят материал, размазывают его по стеклу тонким слоем.

2. Сушку мазков проводят на воздухе, и практически одновременно проводят фиксацию (для этого используют пламень спиртовки или газовую горелку).

3. Окраска по Граму. Для этого предметное стекло держат слегка в наклонном положении. Для окрашивания используют краситель — феноловый раствор геницианового фиолетового (или кристаллического фиолетового). Процесс окрашивания должен длиться в течение 1 минуты.

4. Краситель — феноловый раствор геницианового фиолетового сливают. Сверху наливают раствор Люголя. Держат в таком состоянии в течение 1 минуты. В результате мазок должен почернеть. При проведении данной процедуры также рекомендуется держать предметное стекло с мазками слегка в наклонном положении.

5. Полученный препарат промывать водой не нужно. Препарат обрабатывают 96% спиртом (15–20 секунд).

Необходимо обязательно следовать установленным срокам окрашивания красителями и обесцвечивания спиртом. Например, при превышении срока на обработку спиртом грамположительные микробы могут также обесцветиться, или наоборот, при недостаточной обработке препарат полностью может окраситься в цвет красителя.

6. Препарат после обработки спиртом промывают водой и наносят краситель фуксин Пфейфера. Процедуру окрашивания проводят в течение 1 минуты.

Результат этой окраски: грамположительные микробы окрашиваются в фиолетовый цвет, а обесцвеченные грамотрицательные микроорганизмы окрашиваются в цвет дополнительного красителя фуксина — красный (см. рис. 72).

Чаще всего в качестве объектов исследования рекомендуют следующие микроорганизмы: из грамположительных — *Bacillus subtilis* или *Bacillus mesentericus*; из грамотрицательных — *Escherichia coli*.

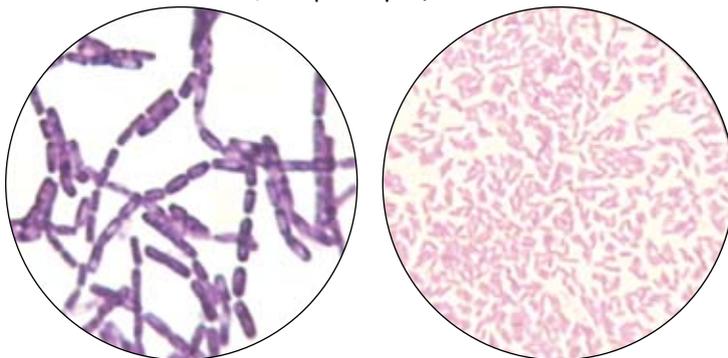


Рисунок 72. Характерная окраска по Граму:

а — грамположительные бактерии (*Bacillus pseudoanthracis*);

б — грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli*)

[Микробиологический практикум: учебное пособие / К.Л. Шнайдер, М.Н. Астраханцева, З.А. Канарская, 2010].

3. Выявление спор в клетках бактерий

Способ Ожешко. Для исследования спор изготавливают микропрепарат из *Bacillus subtilis* или *Bacillus mesentericus*.

Техника окрашивания:

1) на обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей или пипеткой наносят исследуемый материал; размазывают его по стеклу;

- 2) мазок высушивают;
- 3) препарат фиксируют; для этого предметное стекло с мазком проводят над пламенем спиртовки или горелки; после процедуры препарату дают остыть;
- 4) на препарат наносят 5%-й раствор хромовой кислоты; выдерживают в течение 5–10 минут;
- 5) раствор хромовой кислоты смывают водой;
- 6) на полученный препарат накладывают фильтровальную бумагу и добавляют карболовый фуксин Циля;
- 7) Получившийся препарат подогревают над пламенем горелки; после появления паров препарат быстро убирают с пламени и вновь смачивают красителем. Такие манипуляции проделывают в течение 7 минут. В результате краситель — раствор хромовой кислоты — должен испариться, а фильтровальная бумага — высохнуть;
- 8) препарат охлаждают; после того как препарат остынет фильтровальную бумагу убирают;
- 9) препарат промывают чистой водой. Лишнюю оставшуюся воду собирают фильтровальной бумагой. В результате этих манипуляций должны получиться равномерно прокрашенные клетки со спорами;
- 10) цитоплазму подвергают обесцвечиванию; для этого препарат обрабатывают 1%-м раствором соляной или серной кислоты. Процедуру проводят в течение 16–18 секунд;
- 11) после обесцвечивания препарат промывают чистой водой и окрашивают красителем метиленовым синим. Время окраски длится 2 минуты.

Результат: споры должны быть окрашены в красный цвет, а цитоплазма в голубой.

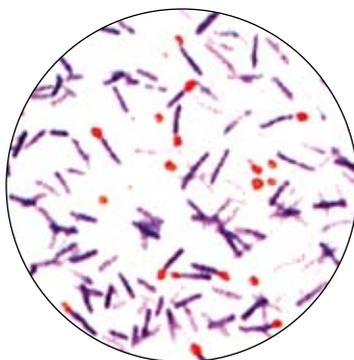


Рисунок 73. Окраска спор по Ожешко
[Микробиология / Ф. К. Черкес, Л. Б. Богоявленская,
Бельская Н. А., 2014].

4. Выявление включений в клетках микроорганизмов

В процессе жизнедеятельности микроорганизмы образуют продукты метаболизма и запасные питательные вещества. К включениям клетки относятся: жиры, высокомолекулярные углеводы, волютин, кристаллы щавелевой кислоты и другие. Включения — это необязательные компоненты клетки. Их формирование может быть связано с возрастом микробов, а также с условиями культивирования.

Выявление гликогена. Обычно для выявления гликогена используют культуру *Saccharomyces cerevisiae*.

Техника обнаружения:

- 1) на чистое обезжиренное предметное стекло стерильной пипеткой вносят жидкий исследуемый материал;
- 2) сверху наносят небольшую каплю раствора йода в йодиде калия;
- 3) сверху получившуюся суспензию накрывают покровным стеклом; Излишнюю жидкость убирают с помощью фильтровальной бумаги;
- 4) Приготовленный препарат микроскопируют с помощью микроскопа с масляной иммерсией.

Результат: клетки, содержащие гликоген, окрашиваются в желто-коричневые и коричнево-бурые цвета.

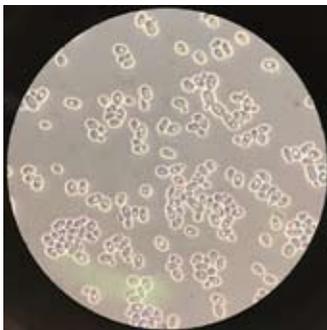


Рисунок 74. Выявление гликогена *Saccharomyces cerevisiae*
[URL: https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces_cerevisiae_100x_phase-contrast_microscopy2.jpg]

Выявление гранулезы. Для выявления гранулезы обычно используют культуру маслянокислых бактерий.

Техника выявления:

- 1) на обезжиренное предметное стекло наносят исследуемую культуру. Сверху исследуемой культуры наносят каплю раствора Люголя;

2) сверху препарат накрывают покровным стеклом; от лишней выступающей жидкости избавляются фильтровальной бумагой;

3) Получившийся препарат микроскопируют масляной иммерсией.

Результат: гранулеза в клетках окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

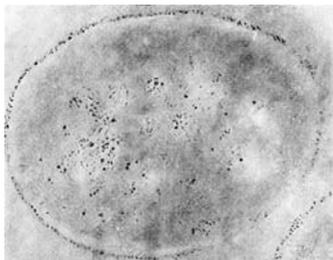


Рисунок 75. Выявление гранулезы

[Жизнь растений / под ред. А.Л. Тахтаджяна, главный редактор — чл.-кор. АН СССР, проф. А.А. Федоров. — Москва, 1974].

Выявление полифосфатов (валютина) методом Омелянского.

Техника выявления:

1) на предметное стекло вносят исследуемую культуру. Фиксируют мазок над пламенем огня спиртовки или газовой горелки;

2) мазок на препарате окрашивают красителем карболовым фуксином Циля. Время окрашивания — 30–60 секунд;

3) краситель карболовый фуксин Циля смывают чистой водой;

4) промытый препарат обесцвечивают воздействием 1%–раствора серной кислоты. Время обесцвечивания — 20–30 секунд.

5) препарат промывают от серной кислоты водой;

6) промытый препарат окрашивают метиленовым синим (в течение 1 минуты);

7) получившийся препарат снова промывают чистой водой, сушат на воздухе; рассматривают препарат с помощью микроскопа с иммерсионной системой.

Результат: гранулы валютина окрашены в красный цвет, цитоплазма окрашена в синий.

Окраска зерен валютина по методу Нейссера.

Техника окрашивания включает в себя следующие действия:

1) на очищенное обезжиренное стекло наносят исследуемый материал; полученный мазок подвергают фиксации;

2) на мазок вносят ацетат синьки Нейссера. Длительность окрашивания — 2–3 минуты;

3) излишек красителя удаляют и добавляют раствор Люголя; длительность данной процедуры — 10–20 минут;

4) получившийся микропрепарат промывают от раствора чистой водой;

5) дополнительно препарат подвергают окрашиванию раствором везувина или хризоидина. Данную процедуру проводят в течение 30–60 мин.

6) после окрашивания препарат снова промывают водой; рассматривают под микроскопом.

Результат: в связи с тем, что гранулы волютинина проявляют щелочную реакцию, они после процедуры окраски приобретают темно-синий цвет; цитоплазма клеток проявляет кислую реакцию и восприимчива к другому красителю — везувину. Цитоплазма окрашивается в желтый цвет.

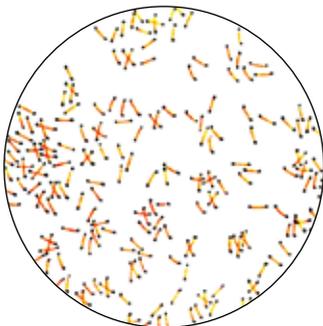


Рисунок 76. *Corynebacterium diphtheriae*. Окраска по Нейссеру. [Руководство к практическим занятиям по общей микробиологии / под ред. профессора В. А. Романова. — Ярославль, 2008, с. 108].

Окраска капсул. У многих бактерий есть способность образовывать капсулу. Капсула бактерий представляет собой слизистый слой, который обволакивает клеточную стенку (см. рис. 77).

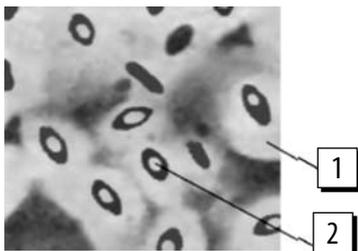


Рисунок 77. Споры и капсулы клеток *Clostridium*: 1 — капсула; 2 — спора [Микробиологический практикум: учебное пособие / К. Л. Шнайдер, М. Н. Астраханцева, З. А. Канарская, 2010].

К образованию капсул способны возбудители сибирской язвы, диплококковая септицемия. Основная функция капсул — это защита микроорганизмов от различных воздействий, бактериофагов, обезживания, высыхания. Капсулы разных видов бактерий отличаются химическим составом. Для выявления капсул бактерий используют специальные методы, так как при обычном окрашивании бактерии остаются такими же бесцветными.

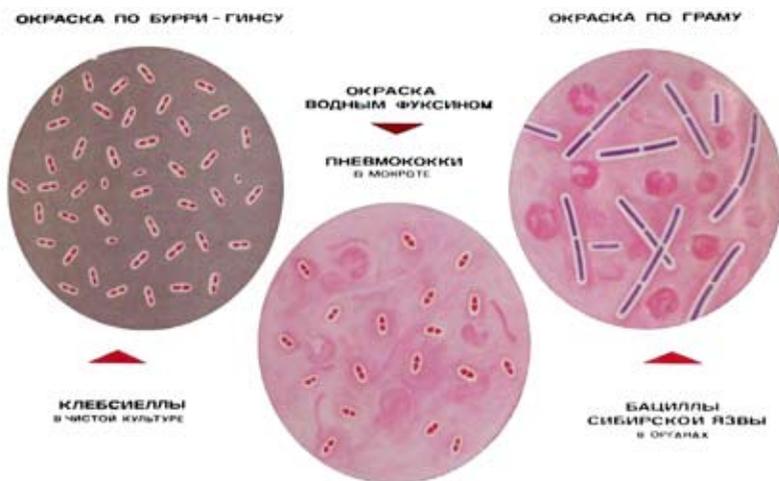


Рисунок 78. Методы выявления капсул у бактерий
 [Наиболее распространенные методы окраски бактерий:
 учебное пособие / под ред. д. м. н., профессора Г. И. Чубенко.
 — Благовещенск, 2017].

5. Техника выявления капсул (негативный метод Бурри)

- 1) предметное стекло для изготовления препарата обезжиривают смесью из эфира и спирта;
- 2) на стерильное предметное стекло наносят каплю туши, а затем — небольшое количество исследуемого материала, который содержит бактерии; исследуемое вещество размазывают по стеклу тонким слоем (сделать это можно покровным стеклом);
- 3) препарат оставляют высыхать (на воздухе);
- 4) высушенный готовый препарат рассматривают с помощью микроскопа с иммерсионной системой.

Результат: капсулы и бактерии не окрашены, а фон темно-дымчатый.

Окраска по Романовскому — Гимзе

Применяется для обнаружения волютина, ДНК клеток бактерий.

Порядок действий: Обычным способом готовят мазок на предметном стекле исследуемого материала. Затем препарат помещают в чашку Петри и добавляют краску под мазок. Для окрашивания используют 1 каплю готовой краски на 1 мл воды. Окрашивают в течение 1–24 часов. На следующем этапе окрашенный препарат промывают водой (подщелоченной) и оставляют высыхать.

Результат: цитоплазма клеток окрашивается в сине-фиолетовый цвет; генетический материал (ДНК) окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

Краска Романовского — Гимзе состоит из смеси азура, эозина и метиленового синего.



Рисунок 78. Окраска по Романовскому — Гимзе
[Наиболее распространенные методы окраски бактерий:
учебное пособие / под ред. д. м. н., профессора Г. И. Чубенко.
— Благовещенск, 2017].

Контрольные вопросы

1. Какие бывают типы окрасок микропрепаратов и чем они отличаются?
2. Охарактеризуйте основные виды окрасок микропрепаратов.
3. Как осуществляется простая окраска микропрепаратов?
4. Опишите дифференциальные методы окрашивания полифосфата.
5. Назовите основные методы окраски спор и результаты окрашивания.
6. Назовите методики окрашивания для выявления гликогена и гранулезы у микроорганизмов.

Тема 4

Питательные среды. Классификация. Получение

4.1. Назначение питательных сред

Питательная среда или культуральная среда — это твердое, жидкое или полутвердое вещество, предназначенное для поддержки роста популяции микроорганизмов.

Применяют питательные среды:

- для выделения чистых культур микроорганизмов;
- используют для размножения микроорганизмов в лабораторных условиях;
- для санитарно-бактериологических исследований различного сырья, продуктов питания, микрофлоры воздуха, воды, а также для других исследований.

Питательная среда должна включать все элементы, необходимые для нормального развития клетки.

В состав питательных сред должны входить следующие компоненты:

— *источники углерода.* Основными источниками являются окисленные молекулы углеводов, спирты, органические кислоты и другие;

— *источники азота.* Основные источники: белки, пептон, соли аммония, нитраты;

— *источники макро- и микроэлементов.* Они должны находиться в форме легко усваиваемых микроорганизмами соединений;

— *ростовые вещества,* в соответствии с типом питания. Чаще всего выделяют дрожжевые экстракты, дрожжевые автолизаты, реже — растворы витаминов, аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований. Выделяют бактерии: прототрофы — способные самостоятельно синтезировать необходимые вещества для роста; аскотрофы, которым необходимы определенные факторы роста;

— *достаточное количество воды.* Участвует в обеспечении питательных сред определенным осмотическим давлением, оптимальной вязкостью, влажностью, необходимой кислотностью.

4.2. Классификация и применение питательных сред

По исходным компонентам, то есть по составу, выделяют следующие виды питательных сред:

1. *Естественные питательные среды.* В основе таких питательных сред лежат натуральные продукты животного или растительного происхождения. Среда характеризуется сложным составом. Эти среды применяются для выращивания и размножения микроорганизмов, накопления биомассы микробов, сохранения чистых культур. Недостатки таких сред: нельзя точно определить качественный и количественный состав. В связи с этим невозможно их использовать для исследования обмена веществ микроорганизмов.

2. *Синтетические питательные среды.* Получают их из химических соединений в точно установленных концентрациях и соотношениях (углеводы, соли, аминокислоты, витамины). В зависимости от набора компонентов данный тип среды может быть *сложным* и *простым*. Сложные синтетические среды чаще всего предназначены для выращивания молочнокислых бактерий, простые — среды для выращивания автотрофных микроорганизмов. Добавляя в синтетические среды естественные и искусственные среды, можно получить полусинтетические среды. Отличительной особенностью этих сред является то, что, помимо определенных химических соединений, в своем составе они имеют также вещества с неопределенным составом, например, гидролизат казеина.

По составу выделяют:

1. *Простые* питательные среды (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон).

2. *Сложные* питательные среды (вводят дополнительные компоненты: кровь, сыворотка крови).

Мясо-пептонный бульон (МПБ) является основой для всех остальных питательных сред (рис. 79). Получают его несколькими способами. Основной способ — из мясной воды и готового пептона. Другой способ заключается в получении мясо-пептонного бульона на переварах продуктов гидролиза исходного сырья с участием ферментов. Пептон — продукт неполного разложения белков, состоящий из аминокислот и полипептидов.

Мясо-пептонный бульон является хорошей средой для выращивания многих микроорганизмов.

Мясо-пептонный агар получают добавлением в мясо-пептонный бульон агар-агара с концентрацией в пределах 1,5–3%.



Рисунок 79. Мясо-пептонный бульон [Алешина, Е. С., 2017].

По консистенции выделяют следующие питательные среды:

- жидкие;
- полужидкие;
- сыпучие;
- сухие.

Применение *жидких питательных сред*: исследование физиолого-биохимических свойств микробов, использование для накопления биомасс, накопления продуктов метаболизма. Также важным направлением применения является хранение многих микроорганизмов, которые плохо развиваются на плотных средах.

Полужидкие питательные среды применяют для хранения микробных культур, реже — для накопления биомассы микроорганизмов.

Добавляя в жидкие питательные среды уплотнитель — агар-агар, получают *плотные питательные среды*. Агар-агар получают из морских водорослей; он характеризуется содержанием высокомолекулярных углеводов, не разрушается и не теряет свою ценность при стерилизации паром под давлением, не распадается под действием большинства микробов, не тормозит и не снижает развитие микроорганизмов. По внешнему виду агар-агар — это желтоватый порошок. Для получения плотных питательных сред используют агар-агар в концентрации 1,5–3%. Пример: мясо-пептонный агар, сусло-агар.

Реже уплотнение сред осуществляют добавлением желатина или кремнекислого геля. Желатин представляет собой продукт неполного гидролиза белка коллагена, который выделяют из кожи, костей и хрящей животных. Желатин характеризуется низкой температурой плавления (25–30°C), а также, по сравнению с агар-агаром, разлагается под действием протеолитической активности большинства микроорганизмов. Для получения плотных питательных сред используют желатин в концентрации 10–12%.

Селикагель, или кремнекислый гель представляет собой высушенные перенасыщенные растворы кремниевых кислот. Этот уплотнитель в своем составе не содержит органических соединений, поэтому его используют преимущественно для выращивания хемолитоавтотрофов.

Применение плотных питательных сред: получение чистых культур и их хранение, изучение морфологических признаков, проведение диагностики, количественного учета микроорганизмов.

Питательные среды называют *сухими*, если их влажность не превышает 10%. По внешнему виду они представляют собой порошок или гранулы, которые хорошо растворяются в воде.

Сухие питательные среды активно используют в промышленной микробиологии (примеры: разваренное пшено, отруби, почва).

По целевому назначению питательные среды бывают:

— *основные* (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, пептонная вода);

— *универсальные*;

— *обогащенные*;

— *специальные*;

— *элективные*;

— *дифференциально-диагностические*;

— *индикаторные*;

— *транспортные среды*.

Универсальные питательные среды являются основным типом для выращивания и накопления большинства видов микробных клеток, а также первоначального выделения видов в смешанных популяциях.

Перевар Хоттингера. Для приготовления перевара Хоттингера используют мясные отходы, которые заливают кипящей водой в соотношении 1:2, подвергают кипячению, а затем охлаждению до 45°C. В получившуюся смесь вводят ферментный препарат — панкреатин, подщелачивают, вводят хлороформ. На последнем этапе приготовления оставляют выдерживаться на 10 дней.

Мясо-пептонная желатина. Приготовление мясо-пептонной желатины включает следующие действия: 1 литр мясо-пептонного бульона смешивают с желатином (до 10–20%), полученную смесь нагревают, доводят до необходимой pH среды. Важными этапами приготовления являются кипячение, фильтрование. Полученную мясо-пептонную желатину разливают по пробиркам и подвергают стерилизации паром под давлением 1 атм. в течение 20 минут (автоклавирование).

Полужидкий мясо-пептонный агар (МПА). Для получения полужидкого мясо-пептонного агара в мясо-пептонный бульон вносят 0,55% агара, который затем кипятят, доводят до необходимого уровня pH среды. Смесь подвергают фильтрации и стерилизации.

Агар Хоттингера. Для приготовления питательной среды используют агар-агар в концентрации 2%, который вносят в бульон Хоттингера. По мере необходимости в агар Хоттингера добавляют дополнительные компоненты: соли, углеводы, сыворотка крови. Цвет питательной среды: светло-коричневый. Применение: разведение и выращивание разных микроорганизмов, например бактерий семейства *Enterobacteriaceae* или рода *Staphylococcus*. Компоненты плотной питательной среды создают благоприятные условия для роста микробов.

Практические задания

1. Приготовление питательных сред

Приготовление питательных сред включает в себя следующие основные этапы:

- 1) варку;
- 2) установление оптимальной величины pH;
- 3) осветление;
- 4) фильтрацию;
- 5) розлив;
- 6) стерилизацию;
- 7) контроль.

Варка. Варку питательных сред проводят главным образом на открытом огне, водяной бане, в автоклаве.

Установление оптимальной pH среды. Для установления необходимого уровня pH питательной среды обычно используют индикаторы. Чаще всего при получении питательных сред используют индикатор — метанитрофеналом.

Осветление. При помутнении сред используют процесс осветления. Для осветления питательной среды выполняют следующие действия: среду нагревают до 50°C, добавляют взбитый с водой белок, полученную смесь подвергают кипячению. Свернувшийся белок после кипячения вместе с частицами выпадает в осадок.

Фильтрация. Фильтруют среды, в состав которых входит желатин с помощью бумажных или матерчатых фильтров. Среда, в состав которой входит агар-агар, быстро застывает, в связи с чем процесс фильтрации затрудняется. Фильтруют такие питательные среды, используя ватно-марлевые фильтры. Часто вместо фильтрации таких

сред используют отстаивание. Для этого цилиндрический сосуд с агаровой средой расплавляют в автоклаве. При остывании мелкие частицы выпадают в осадок на дно.

Розлив. Для этого используют различную посуду: пробирки, колбы, флаконы, небольшие химические бутылки. Разливают среды в сухую стерильную посуду с помощью воронки. Для того чтобы отобрать нужную дозу среды применяют бюретки, пипетки, мензурки, дозаторы или другую мерную посуду.

2. Посев на питательную среду

Посев микроорганизмов на питательную среду является важным этапом культивирования. Основной целью посева является ограждение необходимого посевного материала от посторонних микроорганизмов. Поэтому выполнение посева рекомендуется проводить в стерильных помещениях, во время работы не отвлекаться, действовать быстро, не производить резких движений

Общие правила посева микроорганизмов на питательную среду:

— для забора жидкого посевного материала используют бактериальные петли или пипетки. Пипетки используют в том случае, если нужно отобрать определенное количество материала. Плотный материал обычно берут бактериальной петлей;

— все действия, связанные с посевом материала и выделением микробных культур, производят над пламенем горелки;

— перед тем, как взять посевной материал, бактериальную петлю прокалывают над пламенем горелки, а затем остужают;

— после окончания работы бактериальную петлю прокалывают над пламенем горелки с целью устранения оставшихся на ней микроорганизмов из посевного материала;

— пипетки, шпатели погружают в дезинфицирующий раствор;

— чашки Петри и пробирки после окончания посева подписывают, указывают названия (у чашки Петри — со стороны дна, у пробирки — в верхней части), номер, дату посева.

Способы посева материала на питательную среду:

— *посев бактериальной петлей «Штрих».* Материал втирают бактериологической петлей по поверхности питательной среды у края чашки Петри. Удаляют избыток, оставшийся материал рассеивают параллельными штрихами по питательной среде;

— *посев шпателем по «методу Дригальского».* Посевной материал вносят в питательную среду бактериологической петлей, который затем с помощью шпателя равномерно распределяют по поверхности;

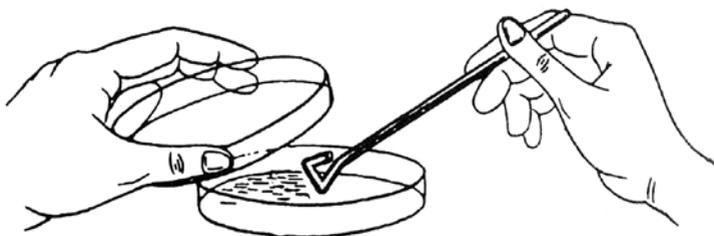


Рисунок 80. Посев шпателем Дригальского на питательную среду [Павлович, С. А. Медицинская микробиология. — Минск: Высшая школа, 1998. — 133 с.]

— посев на секторы. Для начала дно чашки Петри делят на небольшие секторы. С помощью зигзагообразных движений, начиная от края к центру, выполняют посев материала. Выполняют посев таким образом, чтобы нанесенные штрихи с одного сектора не переходили на другой;

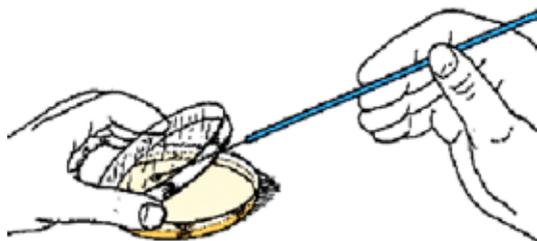


Рисунок 81. Посев с помощью микробиологической петли [Павлович, С. А. Медицинская микробиология. — Минск: Высшая школа, 1998. — 133 с.]

— посев газонем. Суть данного метода посева заключается в следующем. Посевной материал (1 мл) аккуратно распределяют по всей поверхности питательной среды. Избыток материала устраняют с помощью стерильной пипетки. После окончания процедуры посева чашки Петри закрывают крышками и переворачивают вверх дном;

— посев уколом. Пробирку с агаром или желатином держат дном вверх. Материал, подлежащий посеву, берут платиновой иглой, которую отвесно вкалывают в поверхность агара или желатина и продвигают по оси пробирки до самого дна. Иглу затем извлекают, обжигают и закрывают пробирку пробкой;

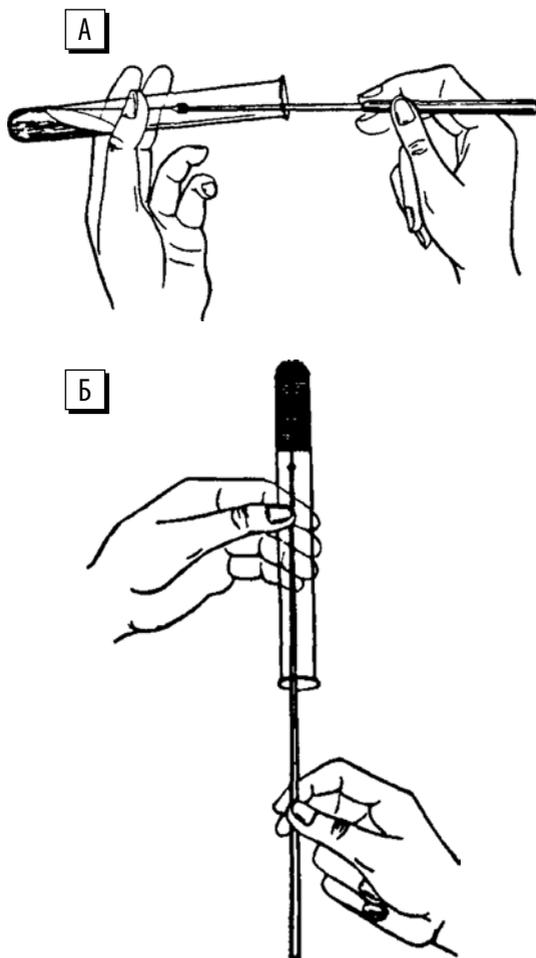


Рисунок 82. Посевы материала (культуры) бактериальной петлей на скошенную среду (А) и уколom в столбик среды (Б)
 [Павлович, С.А. Медицинская микробиология. — Минск: Высшая школа, 1998. — 133 с.]

Выделяют несколько способов посева микроорганизмов:

— Посев из пробирки в пробирку.

Суть этого способа заключается в следующем:

1. Две пробирки — один с посевным материалом, а другой с питательной средой держат левой рукой (между большим и указатель-

ным пальцем). Пробирки держат таким образом, чтобы края были на одном уровне.

2. Правой рукой берут бактериальную петлю и стерилизуют над пламенем горелки.

3. Края пробирок проводят над пламенем горелки. Пробирки не отпускают.

4. Хорошо прокаленную бактериальную петлю вводят (проводя через пламя) в пробирку с материалом для посева, затем охлаждают. Бактериологической петлей набирают небольшое количество посевного материала, которую затем переносят во вторую пробирку с питательной средой.

Если посев проводят в жидкую среду, посевной материал размазывают по стенке пробирки над питательной средой и растирают. Затем смывают жидкой средой.

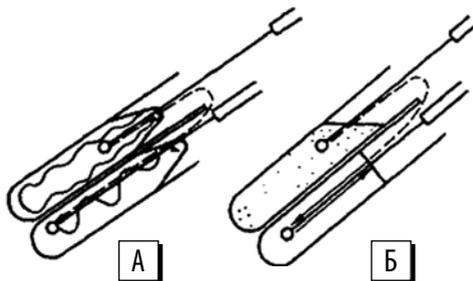


Рисунок 83. Посев из пробирки в пробирку:

А — с плотной на плотную; Б — с жидкой на жидкую
[Павлович, С. А. Медицинская микробиология. — Минск: Высшая школа, 1998. — 133 с.]

Посев на пробирки с чашки Петри:

1. Сначала посевной материал хорошо изучают, определяют характер роста культуры на чашке.

2. Со стороны дна чашки Петри отмечают необходимый участок посевного материала.

3. Чашку Петри удобно располагают перед собой крышкой вверх.

4. Стерилизуют бактериальную петлю.левой рукой прикрывают крышку чаши Петри, правой рукой вводят в нее прокаленную петлю. Охлаждают петлю.

5. Бактериальной петлей набирают немного посевной культуры с заранее отмеченного участка.

6. Бактериальную петлю с посевным материалом аккуратно вынимают из чаши. Чашку закрывают крышкой.

7. Лево́й руко́й беру́т пробирку́ с пита́тельной сре́дой. Посев на пита́тельную сре́ду прова́дят анало́гично с посе́вом из пробирки́ в пробирку́.

8. После посе́ва ча́шку Пе́три с ма́териалом перево́рачиваю́т вер́х дном.

Посев на ча́шки Пе́три свер́ху или снizu:

1. Из ко́лбы с по́мощью сте́рильной пипетки́ отбираю́т небольшо́е коли́чество посе́вного ма́териала.

2. Для посе́ва «снizu» акку́ратно приподнимаю́т кры́шку ча́шки Пе́три. Че́рез образова́вшуюся щель сте́рильной пипеткой́ вно́сят посе́вной ма́териал (одну́ небольшо́ую ка́плю).

3. Да́лее кры́шку ча́шки убираю́т. Разво́рачиваю́т ча́шку Пе́три с ка́плей посе́вного ма́териала к пла́мени спи́ртовки, и в то́ же вре́мя с по́мощью обеззара́женного сте́рильного шпателя́ разма́зывают (растираю́т) ка́плю по́ дну ча́шки. За́тем ча́шку Пе́три вно́вь закрываю́т кры́шкой.

4. В ка́честве пита́тельной сре́ды гото́вят мя́со-пепто́нный ага́р. Акку́ратно приподня́в кры́шку ча́шки Пе́три, залива́ют распла́вленный МПА. Для ра́вномерного́ распе́деления пита́тельной сре́ды по́ поверхно́сти ча́шку Пе́три немно́го пока́чиваю́т;

5. Для благо́приятного́ разви́тия микроорга́низмов на кры́шку ча́шки Пе́три накла́дыва́ется смоченная́ фильтровка́льная бума́га. При призна́ках высы́хания бума́гу увлажня́ют. При посе́ве «снizu» отме́чается преиму́щественный ро́ст анаэ́робов.

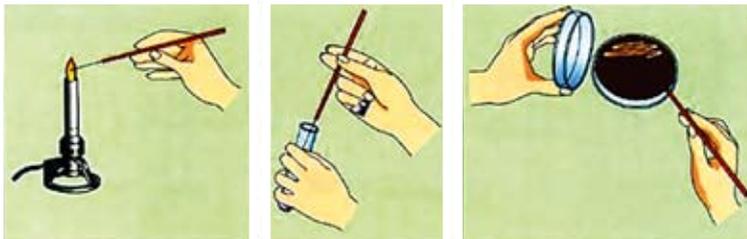


Рисунок 84. Посев на пробирки с ча́шки Пе́три
[URL: <http://metodosdsiembras.blogspot.com/2011/09/v-behaviorurldefaultvmlo.html>]

Контрольные вопросы

1. Ка́ково назна́чение пита́тельных сре́д?
2. Ка́кие компо́ненты дол́жны вхо́дить в со́став пита́тельных сре́д?
3. Ка́кие ви́ды пита́тельных сре́д бы́вают по́ со́ставу?

4. Какие питательные среды бывают по консистенции?
5. Охарактеризуйте виды питательных сред целевому назначению.
6. Какие существуют обогащенные питательные среды?
7. Охарактеризуйте селективные питательные среды.
8. Назовите этапы приготовления питательных сред.

4.3. Получение и выделение чистых культур микроорганизмов

Чистые культуры — это культуры одного вида микроорганизмов. Чистые культуры выращивают на жидких и плотных питательных средах. Если в культуре число видов два и более, ее называют *смешанной культурой*.

Штамм — это культуры одного вида, выделенные из определенных источников, а также отличающиеся от других представителей особыми свойствами.

Среди микроорганизмов выделяют: аэробы и анаэробы.

Аэробы — это микроорганизмы, которым нужен постоянный доступ к кислороду.

Анаэробы — это микроорганизмы, на которые присутствие кислорода влияет негативно, а в отдельных случаях может быть даже губительным.

Морфологические, культуральные и ферментативные признаки микробов для установления таксономического положения микроорганизма, исследуют только в чистой культуре бактерий. Суть проблемы выделения чистой культуры состоит в следующем: помимо необходимого микроорганизма, исследуемая культура может содержать и другие сопутствующие микробы. С помощью различных методов посева на питательные среды достигается рост бактерий отдельными колониями. Пересев одной изолированной колонии позволяет выделить чистую культуру возбудителя, поскольку каждая колония развивается в результате размножения одной клетки.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов делят на две группы:

— методы, которые основаны на принципе механического разделения микробов;

— методы, которые основаны на биологических свойствах микроорганизмов.

Выделяют следующие методы выявления чистых культур, которые основаны на механическом разъединении клеток аэробных микроорганизмов:

— метод Пастера;

— метод Коха;

- метод фракционного посева;
- модификация фракционного посева по Дригальскому.

К методам выявления чистых культур, основанных на учете биологических особенностей микроорганизмов, относят:

- метод заражения лабораторных животных;
- метод прогревания;
- химический метод;
- метод Мечникова и Шукевича.

Практические задания

1. Выделение чистых культур микроорганизмов различными методами : Пастера, Коха, фракционированного посева

Метод Пастера. Метод основан на последовательном разведении материала на жидкой питательной среде. Технология выделения чистых культур этим методом состоит в следующем. Предварительно заранее готовят мясо-пептонный агар. Используют несколько пробирок (иногда — до 10) с мясо-пептонным бульоном (9 мл). В одну пробирку (содержащий МПБ) с помощью стерильной пипетки вносят материал для исследования и тщательно размешивают. Затем из этой пробирки берут небольшое количество полученной суспензии (1 мл) и вносят ее во вторую пробирку. Снова перемешивают. Аналогичным образом из второй пробирки также отбирают немного материала и переносят в третью пробирку. Перемешивают. Данную процедуру проводят до тех пор, пока не закончатся пробирки с МПБ.

Этот метод основан на предположении Пастера о том, что последней пробирке возможен рост только одного вида микроорганизма. На сегодняшний день этот метод применяют только как вспомогательный других методов при выявлении чистых культур аэробов.

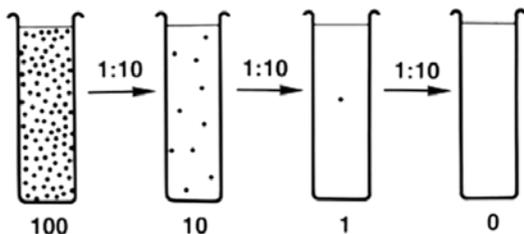


Рисунок 85. Выделение чистых культур микроорганизмов методом Пастера [Концевая, И. И. Микробиология: практическое пособие для студентов].

Метод Коха. Техника выделения чистых культур по методу Коха включает в себя:

1. Предварительно получают мясо-пептонный агар, который затем расплавляют и охлаждают до 45–50°C.

2. Этап разведения материала в мясо-пептонном агаре. Для этого готовят 4 или 5 пробирок с мясо-пептонным агаром (по 10–15 мл), в котором разводят исследуемый материал.

3. На следующем этапе материал из каждой пробирки высвобождают в чашку Петри.

4. Чашку Петри закрывают крышкой и ждут застывания агара. После этого чашку с содержимым оставляют в термостате на 18, 20, 24 и 48 часов.

Результат: на поверхности агара должны вырасти колонии аэробных микробов. Отмечают изолированные колонии. Отбирают нужную колонию и пересеивают на другую питательную среду. Затем оставляют в термостате. В итоге процедур вырастает чистая культура аэробов.

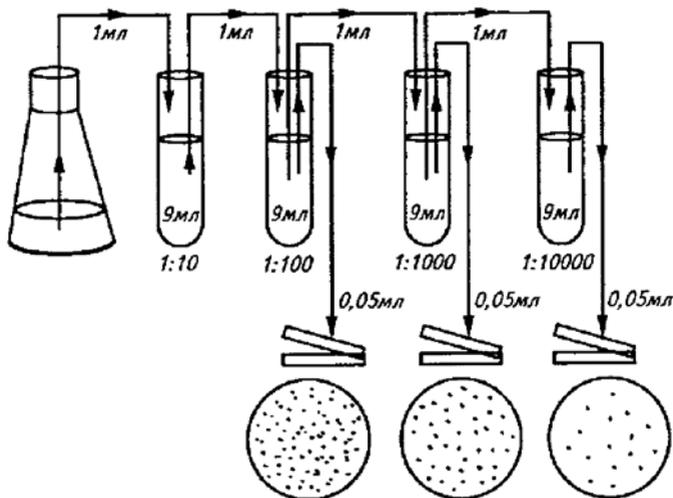


Рисунок 85. Выделение чистых культур микроорганизмов методом Коха [Концевая, И.И. Микробиология: практическое пособие для студентов].

Метод фракционированного посева. Техника фракционного выделения чистых культур включает следующие действия:

1. Предварительно готовят четыре или пять чашек Петри мясо-пептонного агара.

2. В чашку Петри вносят небольшую каплю исследуемого материала и шпателем размазывают по поверхности агара.

3. Этим же шпателем засевают исследуемого материала на поверхность агара второй чашки Петри. Аналогично данную процедуру (посев материала) проводят с другими чашками Петри.

4. После посева чашки Петри оставляют в термостате в положении «вверх дном».

Преимущественно рост изолированных колоний обычно достигается в последних чашках. Затем необходимую колонию заново пересеивают на другую питательную среду с необходимыми компонентами в составе. Выращивают в термостате.

Биологический метод. Также называют методом заражения лабораторных животных. Суть данного метода заключается в получении чистых культур болезнетворных микроорганизмов путем отделения их от сопутствующих микробов. Материал для исследования (это может быть суспензия какой-нибудь такни) вводят восприимчивому животному. К таким животным можно отнести: белых мышей, морских свинок, голубей. Если окажется, что исследуемый материал содержит болезнетворные (патогенные) микробы, животное гибнет. После вскрытия производят бактериологические посевы из внутренних органов и тканей для получения чистой культуры микробов.

Метод прогревания. Данный метод применяется для выделения спорообразующих бактерий в массе других форм бактерий. Для выявления чистых культур аэробов исследуемый материал прогревают на водяной бане при 80°C в течение 30–40 мин. В результате такой процедуры вегетативные микроорганизмы гибнут. Оставшиеся спорообразующие способны прорасти при посеве их в питательные среды.

Химический метод. Также этот метод называют бактериостатическим. Он основан на воздействии химическими веществами на питательные среды. Для этого метода могут быть использованы следующие химические вещества: различные красители, кислоты, антибиотики. Влияют эти вещества на различные микроорганизмы по-разному. Если на одни виды микроорганизмов химические вещества действуют губительно, то на другие виды могут не оказывать никакого влияния или просто подавлять рост. Например, при добавлении геницианового фиолетового к МППА с глюкозой подавляется рост посторонней микрофлоры при нормальном развитии бруцелл.

Метод Мечникова и Шукевича. Данный метод характерен для выделения чистых культур таких микробов, как протей, столбнячная палочка. Техника выделения чистых культур по этому методу заключается в следующем: небольшую каплю материала вносят в пробирку

со скошенным агаром (обязательно в конденсационную воду). Если в исследуемом материале в смеси с другими бактериями будет присутствовать подвижный аэробный вид микроорганизма, который нужно выделить, то в течение 12–18 часов отмечается рост необходимого вида микроба. Для пересева берут изолированную колонию с верхней части агара. Получают аэробную чистую культуру.

2. Выделение чистых культур анаэробов

Для выделения чистых культур анаэробов используют следующие методы: физические, химические, биологические.

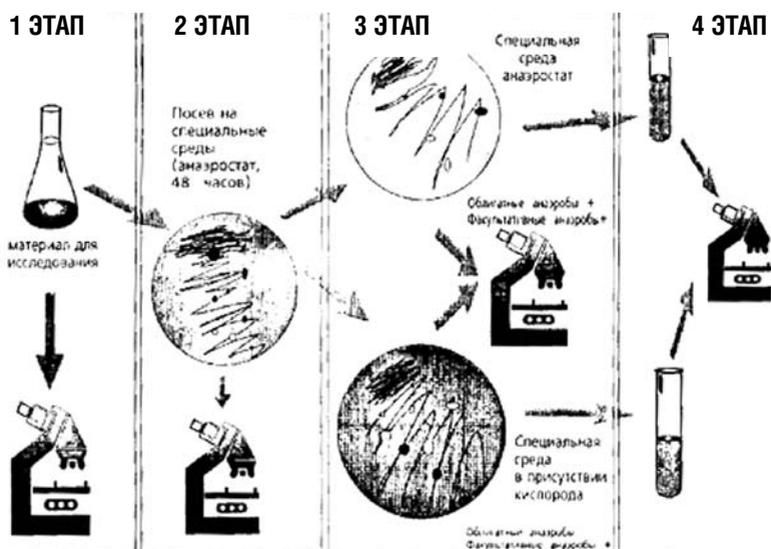


Рисунок 86. Выделение чистых культур анаэробов [Концевая, И. И. Микробиология: практическое пособие для студентов].

Физические методы. Посев исследуемого материала или исследуемой культуры в пробирки с высоким столбиком сахарозного агара.

Микробиологическую иглу смачивают исследуемой культурой. Затем этой иглой осуществляют посев в пробирку с питательной средой. Пробирку с посевами помещают в специальные приборы (эксикатор, анаэроустат), а затем в термостат при температуре 37°C. Результат.

Анаэробные колонии растут в нижних слоях агара. Этот процесс можно заметить через четыре или пять часов.

Использование редуцирующих и окисляющих веществ, которые добавляют в питательную среду. Обычно к редуцирующим или связывающим веществам относят кусочки печени, почек, сердца, мозга. Окислителем является глюкоза. В качестве примера питательной среды, в которую добавляют редуцирующие и окислительные вещества, можно привести питательную среду Китта — Тароцци. Техника выделения чистых культур заключается в следующем. Для предотвращения попадания кислорода в среду предварительно на мясо-пептонный печеночный бульон намазывают вазелинового масла. Кусочки связывающих веществ поглощают растворенный кислород. Глюкозу используют для окисления кислорода воздуха. Питательную среду прогревают в течение 10 или 15 минут при температуре 60°C. Затем осуществляют посев материала. *Результат:* через 3–8 дней можно заметить рост чистой культуры.

Метод с использованием специальных приборов. Анаэростат представляет собой металлический аппарат с толстыми стенками, а также плотно притертой крышкой, на которой имеется отводящий кран. К данному отводящему крану подсоединяют ручной насос для откачки воздуха. Применяют либо ручной, либо электрический насос. На крышке анаэростата находится манометр, который позволяет определять нужное давление. В анаэростат помещают чашки Петри и пробирки с посевами. После размещения посевов крышку закрывают и проводят откачку воздуха. Вместо анаэростата можно использовать эксикатор. Эксикатор представляет собой стеклянную чашеобразную посуду с притертой крышкой.

Метод Виньяля — Вейона. Исследуемую культуру вносят в колбу с подготовленной питательной средой. В качестве питательной среды используют сахарозный или глюкозокровяной агар, который расплавляют и охлаждают до 45–50°C. Содержимое колбы хорошо перемешивают и насыщают в стеклянную трубочку длиной 30 см и диаметром 3–6 мм. Затем капилляр запаивают и помещают в термостат при температуре 37°C на 3–4 суток. После истечения срока в толще питательной среды можно заметить образование колоний микроорганизмов. В стерильных условиях стеклянный капилляр аккуратно вскрывают, извлекают колонию бактериологической петлей и переносят в среду Китта — Тароцци или на глюкозокровяной агар в чашки Петри, после этого помещают их в анаэростат или эксикатор, а затем инкубируют в термостате (+37°C).

Химические методы. Основаны на применении различных химических веществ; в результате их взаимодействия происходит химическая реакция с активным поглощением кислорода воздуха.

Метод с использованием простого химического эксикатора. В стеклянную емкость на специальную подставку помещают чашки Петри с посевами. Предварительно на дно емкости кладут кусочек ваты, смоченный 96-процентным спиртом. Вату поджигают, крышку эксикатора быстро закрывают и плотно притирают к емкости, при этом кислород воздуха сгорает, создавая благоприятные условия для развития анаэробов. Эксикатор помещают в термостат при 37°C для культивирования микроорганизмов.

Метод Аристовского. В две крышки от чашек Петри насыпают порошок углекислой соды и гидросульфит натрия, добавляют немного воды. Одну крышку с химическими веществами помещают на дно эксикатора, затем размещают пробирки или чашки Петри с посевами, а над ними — вторую крышку со смесью порошков. Прибор закрывают и помещают в термостат. В результате взаимодействия химических веществ происходит реакция с поглощением воздуха, что создает благоприятные условия для развития анаэробов.

Биологические методы:

Метод Фортнера. Данный метод основан на совместном выращивании аэробных и анаэробных микроорганизмов в чашках Петри на глюкозокровяном агаре. В результате такого культивирования создаются анаэробные условия. Для этого берут чашки Петри с готовым глюкозокровяным агаром, в стерильных условиях по центру чашки Петри скальпелем вырезают полоску питательной среды шириной 1 см. На первую половину чашки Петри высевают культуру аэробов, на другую — культуру анаэробов. Затем чашки Петри плотно закрывают крышкой. Края чашки Петри заливают расплавленным парафином. Чашку Петри с посевами оставляют в термостате. Через 3–4 суток после того, как аэробные микроорганизмы полностью используют кислород, на глюкозокровяном агаре начнется рост анаэробных микроорганизмов в виде отдельных колоний.

3. Выделение спорообразующих бактерий

Эндоспора — покоящаяся форма бактерий, которая помогает пережить не очень благоприятные условия среды. Бактерии в такой покоящейся форме могут находиться очень долго. К основным представителям бактерий, которые могут образовывать эндоспоры, относят следующие: *Clostridium*, *Bacillus*.

Техника выделения спорообразующих бактерий с помощью негативного окрашивания включает следующие действия:

1. Нарезанный на ломтики нечищенный картофель помещают в колбу с водой.

2. В колбу добавляют немного мела (для поддержания рН).

3. Колбу закрывают ватной пробкой; нагревают в водяной бане при температуре (100°C). Длительность процедуры — 10–15 минут.

4. Колбу оставляют в термостате на 2 или 3 дня. В течение этих дней можно наблюдать за следующими изменениями содержимого колбы: образование слизистой пленки, помутнение жидкости, пенообразование, выделение специфического запаха. Все эти признаки указывают на развитие в среде аэробных спорообразующих бактерий. Вместо картофеля можно использовать стебли волокнистых растений. Например, лен.

5. С истечением двух-трех дней готовят фиксированный микропрепарат из полученной культуры спорообразующих бактерий. В качестве красителя применяют метиленовый синий. Процедуру окрашивания выполняют по алгоритму.

6. Полученный препарат рассматривают под микроскопом с иммерсией. Результат: эндоспоры (имеют сферические или овальные формы) — неокрашенные изнутри; вегетативные клетки бактерий окрашены (см. рис. 87).

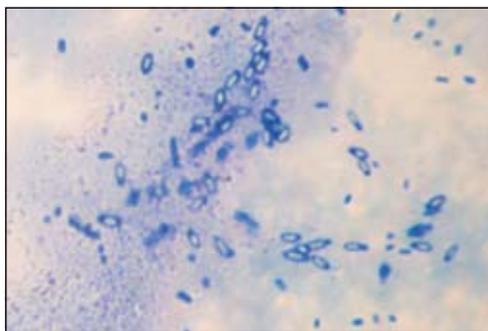


Рисунок 87. Микропрепарат эндоспор
(полученный методом негативного окрашивания).
Увеличение в 1000 раз
[Колоколова, Н. Н. Микробиология, 2018].

7. На получившемся микропреparate изучают формы и размеры вегетативных клеток, спор.

8. Выделяют чистую культуру спорообразующих бактерии на мясо-пептонном агаре методом истощающего штриха или методом Дригальского с последующим отсевом на скошенную агаризованную среду в пробирку.

4. Описание культуральных особенностей бактерий

Культуральные свойства бактерий определяются характером их роста на питательных средах. Питательные среды по консистенции бывают плотные и жидкие. У каждого вида свой характер роста на питательной среде. Колонии бактерий образуются на плотных питательных средах. Колонию образуют изолированные клетки одного вида бактерии. Формируются колонии из одной или нескольких материнских клеток.

Колонии образуются достаточно быстро. Размеры различных колоний обусловлены генетически. Вид колоний зависит от характера питательной среды, компонентов, которые входят в состав среды, а также от различных факторов и условий выращивания. Оценку роста микроорганизмов на плотных питательных средах проводят в проходящем свете с тыльной стороны чашки Петри, а затем — с поверхности в отраженном свете. Оценку колоний проводят как невооруженным глазом, так и при помощи микроскопа и лупы. Под микроскопом, используя объектив (20×), окуляр (10×), в слегка затемненном поле микроскопа определяют края и структуру колоний.

Описание роста микроорганизмов, которые выращены на плотных питательных средах, состоит из следующих пунктов:

1. *Размер колонии.* Колонии бывают разного размера. Если диаметр колоний составляет 4 мм и более — это крупные; если диаметр колоний составляет от 2 до 4 мм, то это средние по размерам колонии; к мелким относят колонии с диаметром от 1 до 2 мм; карликовыми называют колонии, размеры которых не превышают 1 мм.

2. *Форма колонии бактерий.* Выделяют следующие формы:
— правильная форма (овальная, круглая);
— неправильная форма: зубчатая, корневидная, ветвящаяся, складчатая, амёбовидная, ризоидная и другие формы.

3. *Цвет колонии (окраска).* Колонии бывают бесцветными или пигментированными, то есть окрашиваются в цвет вырабатываемого ими пигмента. Также окраска колоний может зависеть от типа и состава питательной среды (компонентов, которые добавляют при приготовлении). Цвет колоний может быть желтым, розовым и т. д.

4. *Характер краев колонии.* Края колоний бывают ровные, волнистые, зазубренные, бахромчатые, нитчатые, ворсинчатые, извилистые, лопастные.

5. *Поверхность.* Поверхность колонии бывает гладкая, блестящая, влажная или морщинистая, матовая, сухая, шероховатая, с радиальной или концентрической исчерченностью.

6. *Рельеф колонии (или профиль колонии)* бывает выпуклым (слабовыпуклым или сильновыпуклым), плоским, конусовидным, кратерообразным или другим.

7. *Прозрачность и блеск колонии.* Колонии бывают прозрачными, непрозрачными, мутными, тусклыми, блестящими.

8. *Консистенция колоний.* Консистенцию колоний можно определить с помощью прикосновения бактериологической петли. Выделяют следующие типы консистенции колоний: плотная, крошковидная, маслянистая, тестообразная, вязкая, пленчатая.

9. *Структура колонии.* Структура колонии может быть гомогенной, аморфной, мелкозернистой, крупнозернистой, волокнистой.

10. *Запах.* Некоторые колонии могут иметь специфичный запах.

Описание роста микроорганизмов выращенных на жидких питательных средах состоит из следующих пунктов:

1. Определение характера и степени помутнения питательной среды. Помутнение среды может быть незначительным, слабым, умеренным и интенсивным.

2. Образование пленки. Пленка может быть нежная или грубая, складчатая или ровная; по консистенции — хрупкая, слизистая, сальная.

3. Наличие пристеночного кольца на поверхности питательной среды.

4. Образование осадка, который выявляется при легком встряхивании пробирки, — он может быть незначительным или обильным, зернистым, хлопьевидным, слизистым, крошковидным.

5. Запах. Некоторые колонии выделяют специфичный запах.

6. Выделение газа. Его обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью поплавков.

Кроме того, выделяют четыре формы роста бактерий на жидких питательных средах:

I. Рост с равномерным помутнением среды. Цвет среды остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроба.

II. Придонный рост. Характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Осадок может быть скудным или обильным, крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев.

III. Пристеночный рост. Питательная среда в пробирке остается прозрачной. Бактерии растут, образуя крупные рыхлые хлопья или, наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда.

IV. Поверхностный рост. Характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки. Внешний вид и характер пленки могут быть различными: тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды.

После исследования всех культуральных свойств по плану, из отдельной бактериальной колонии на питательной среде готовят микропрепарат. Окрашивание проводят по Граму. Затем микропрепарат рассматривают под микроскопом. Для выделения чистой культуры бактерий пересевают необходимую колонию на скошенный мясо-пептонный агар или на мясо-пептонный бульон.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение чистой культуре, смешанная культура, штамм.

2. Назовите основные методы выделения чистой культуры аэробов, на каких принципах они основываются?

3. Назовите основные методы выделения чистой культуры анаэробов, что важно для выделения этой культуры?

4. Расскажите технику выделения спорообразующих бактерий с помощью негативного окрашивания. В чём она заключается?

5. Назовите план исследования роста колоний на плотных питательных средах

6. Назовите план исследования роста колоний на жидких питательных средах



Тема 5

Взаимоотношения микроорганизмов

Трансформация веществ в процессе жизнедеятельности микроорганизмов

Знание физиологических процессов микроорганизмов создает научную основу для проведения культивирования (выращивания) и идентификации (распознавания) видов микробов, а также получения биологических и лечебных препаратов (заквасок, витаминов, ферментов, аминокислот, антибиотиков, вакцин и др.).

Основу жизнедеятельности микроорганизмов, как и всех живых существ, составляет обмен веществ (метаболизм) с окружающей средой.

Термин метаболизм объединяет два взаимосвязанных, но противоположных процесса — *анаболизм* и *катаболизм*.

Анаболизм (питание, ассимиляция, конструктивный или строительный обмен, обмен веществ) сводится к усвоению, т. е. использованию микробами питательных веществ, поступивших из внешней среды, для биосинтеза компонентов собственного тела. Это достигается чаще восстановительными эндотермическими реакциями, для течения которых требуется энергия.

Катаболизм (дыхание, диссимиляция, биологическое окисление) характеризуется расщеплением (окислением) сложных органических веществ до более простых продуктов с освобождением заключенной в них энергии. Эта энергия используется микроорганизмами для синтеза веществ данной клетки.

Метаболизм у микроорганизмов характеризуется интенсивным потреблением питательных веществ. Например, при благоприятных условиях в течение суток одна клетка бактерий усваивает веществ в 30–40 раз больше величины своей массы, соответственно высока и скорость прироста биомассы микроорганизмов. Основная часть пищи расходуется микроорганизмами в энергетическом обмене, при котором в среду выделяется большое количество продуктов обмена: кислот, спиртов, диок-

сид углерода, водород и др. Эта особенность микроорганизмов широко используется в практике переработки растительного, животного пищевого и непищевого сырья и обуславливает порчу пищевого сырья.

Все процессы трансформации веществ у микроорганизмов рассматриваются в процессе брожения.

Брожение — это анаэробный ферментативный окислительно-восстановительный процесс превращения органических веществ, посредством которого организмы получают энергию, необходимую для их жизнедеятельности.

Брожению могут подвергаться спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины, но чаще всего углеводы (главным образом глюкоза).

В соответствии с образуемыми продуктами различают:

- спиртовое брожение;
- молочнокислое брожение;
- пропионовокислое брожение;
- муравьинокислое (смешанное) брожение;
- маслянокислое брожение;
- ацетоно-бутиловое брожение;
- гомоацетатное брожение.

5.2. Молочнокислое брожение

Молочнокислые бактерии относятся к семействам *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*. Распространение в природе молочнокислых бактерий определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способом получения энергии. Они почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

— в молоке, молочных продуктах, в местах переработки молока (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и другие лактобациллы; *Streptococcus lactis*);

— на поверхности растений как эпифитная микрофлора и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leiconostoc mesenteroides*);

— в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных как представители нормальной микрофлоры (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* (зеленящий стрептококк) и др.).

В связи с тем, что молочнокислые бактерии используются для приготовления пищевых продуктов и выступают как возбудители болезней человека и животных, они представляют собой группу большого экономического значения.

Морфология клеток. Это морфологически гетерогенная группа бактерий, она включает в себя палочковидные и сферические организмы, длиной от 0,7–1,1 до 3–8 мкм, расположенных единично или собранных в цепочки. Все молочнокислые бактерии грамположительны, не образуют эндоспор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*), капсул, и в подавляющем большинстве случаев неподвижны. Форма и длина клеток у различных культур одних и тех же видов молочнокислых бактерий часто зависят от состава среды, присутствия кислорода и способа культивирования.

Физиолого-биохимические свойства. Это факультативные анаэробы, использующие в качестве источника энергии углеводы и образующие в качестве основного продукта брожения молочную кислоту (по этому признаку их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов). У всех молочнокислых бактерий **обнаруживаются сложные потребности в факторах роста:** витаминах группы В, аминокислотах, пуринах и пиримидинах. Отличительная **физиологическая особенность молочнокислых бактерий** — их высокая устойчивость к молочной кислоте, что является следствием характерного для них энергетического метаболизма. Способность молочнокислых бактерий образовывать и переносить довольно высокие концентрации молочной кислоты имеет важное селективное значение, так как такое свойство дает им возможность успешно конкурировать с большинством других бактерий в средах, богатых питательными веществами. Молочнокислые бактерии обычно способны только к брожению. **Молочнокислым брожением** называют анаэробное разложение углеводов молочнокислыми бактериями с образованием молочной кислоты и других продуктов. В зависимости от того, какие молочнокислые бактерии вызывают это брожение и какие при этом образуются продукты, оно бывает двух типов — **типичное**, или **гомоферментативное**, и **нетипичное**, или **гетероферментативное**.

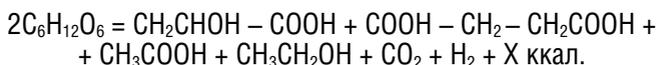
Химизм гомоферментативного молочнокислого брожения прост. Он заключается в гладком расщеплении гексозы на две молекулы молочной кислоты, без образования газообразных продуктов, по следующему суммарному уравнению:



Промежуточными продуктами при этом брожении являются пировиноградная кислота и водород. Присоединяя водород, пировиноградная кислота образует молочную кислоту.

Химизм нетипичного молочнокислого брожения более сложный, так как здесь при сбраживании углеводов, наряду с молочной кислотой, гетероферментативные бактерии образуют ряд других соединений: уксусную и янтарную кислоты, этиловый спирт, углекислоту и водород. Усложнение процесса брожения связано с тем, что эти бактерии содержат в своих клетках фермент карбоксилазу, а у гомоферментативных бактерий он отсутствует.

Общий химизм этого процесса может быть представлен схематическим уравнением так:



Молочнокислые бактерии можно разделить на две физиолого-биохимические подгруппы, различающиеся по продуктам, которые образуются из глюкозы в результате брожения (эта классификация была предложена в 1925 году А. И. Клейвером, Г. Л. Донкером): гомоферментативные и гетероферментативные.

К числу наиболее часто встречающихся типичных **гомоферментативных молочнокислых бактерий** относится молочный стрептококк (*Streptococcus lactis*). В молодых культурах он представляет собой типичный стрептококк, образующий цепочки различной длины из овальных клеток диаметром 0,5–1 мкм (рисунок 9.1 — А). В старых культурах после свертывания молока преобладают сочетания в виде диплококков. Встречается он и в виде коротких бесспоровых палочек, окрашивающихся положительно по Граму. Колонии молочного стрептококка на поверхности твердой питательной среды мелкие, выпуклые, слегка беловатые, напоминающие капли воды или жира. У *Streptococcus cremoris* клетки расположены более длинными цепочками. *Lactobacillus bulgaricus* — крупная палочка длиной 4–5 мкм, неподвижная, грамположительная, располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек, оптимальная температура ее развития 40–45 °С. *Lactobacillus acidophilus* — по морфологии близка к болгарской, но имеет другой температурный оптимум развития — 37 °С; используется для приготовления ацидофилина.

Также весьма важным представителем палочковидных форм типичных молочнокислых бактерий является болгарская палочка

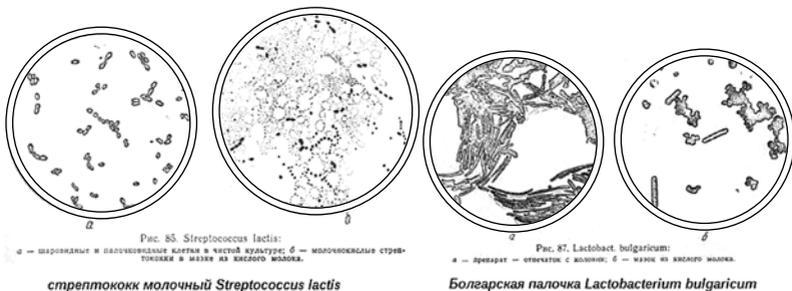


Рисунок 88. Микрофлора кефира
 [URL: <https://propionix.ru/preimuschestva-probioticheskikh-zakvasok>
 (дата обращения 21.08.2024)].

2. Определение в кефире молочной кислоты пробой с фенолом (реакция Уффельмана)

Отфильтровать через бумажный фильтр 1–2 мл сыворотки кефира. В другую пробирку налить 5 мл 5%-го раствора фенола и прибавить несколько капель 1%-го раствора хлорида железа, смесь окрасится в интенсивный синий цвет. Если при добавлении к смеси 1–2 капля сыворотки окраска изменится на бледно-желтоватую, то в сыворотке имеется молочная кислота. Записать ход проведения качественной реакции на молочную кислоту и ее результаты. Записать основные стадии превращения веществ гомоферментативного молочнокислого брожения от глюкозы до молочной кислоты, указав количество молекул АТФ, образуемых при этом брожении из молекулы глюкозы.

Представителями **гетероферментативных молочнокислых** бактерий являются вариабельные по форме бифидобактерии из рода *Bifidobacterium* (*B. bifidum*) и кокковые из рода *Leiconostoc* (*L. mesenteroides*), *Lactobacillus brevis*, *Bacterium coli* и др. Некото-

рые гетероферментативные молочнокислые бактерии (например, *Lactobacterium pentoaceticum*) могут сбраживать пентозы с образованием молочной и уксусной кислот, что имеет место при силосовании кормов. Накапливающиеся при этом кислоты предохраняют силос от порчи. На поверхности прокисшего молока, капусты, кваса, силоса довольно часто развивается молочная плесень *Oidium lactis*, вызывающая порчу молочных и квашеных продуктов и силоса. Этот организм близко примыкает к дрожжам, но некоторыми исследователями относится к несовершенным грибам. Его вегетативное тело представлено белым многоклеточным мицелием, который распадается на отдельные клетки, так называемые оидии, то овальной, то продолговатой формы, служащие для размножения. Молочнокислые бактерии имеют огромное практическое значение, так как вызываемый ими процесс молочнокислого брожения лежит в основе переработки молочных продуктов, квашения овощей, силосования кормов. Молочнокислые бактерии либо продукты их метаболизма активно используют в мясной, рыбной, спиртовой, кожевенной промышленности, медицине и т. д.

3. Изучение бактерий гетероферментативного молочнокислого брожения

На предметном стекле приготовить мазок из рассола квашенной капусты (огурцов), высушить и фиксировать его в пламени спиртовки.

Затем окрасить фуксином в течение 1–2 минут, промыть водой и высушить. С объективом МИ-90 изучить препарат, найти молочнокислые бактерии и дрожжи, зарисовать их и подписать латинские названия *Bifidobacterium* (*B. bifidum*); *Leuconostoc mesenteroides*; *Lactobacillus brevis*

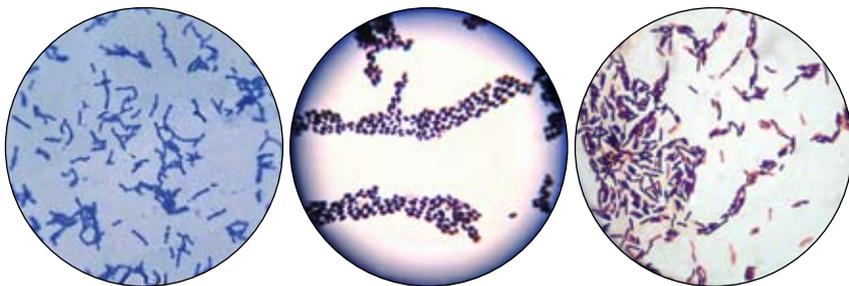


Рисунок 89. Микрофлора рассола квашеной капусты
[URL: https://itexn.com/3116_mikroflora-ofoshhej-i-plodov-pri-kvashenii-solenii-marinovanii.html (дата обращения 21.08.2024)].

4. Обнаружение молочной кислоты в рассоле овощей

Молочная кислота в кислом молоке или других продуктах брожения может быть определена качественными реакциями и количественными методами. Из качественных реакций на молочную кислоту наиболее надежными и специфическими являются:

- 1) перевод молочной кислоты в уксусный альдегид;
- 2) реакция с тиофеном.

1. Для **определения молочной кислоты** прокисшее молоко отфильтровывают через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата прибавляют 1 мл 10%-го раствора серной кислоты, нагревают до кипения и добавляют по каплям 2%-й раствор марганцевокислого калия ($KMnO_4$). При этих условиях молочная кислота почти нацело переходит в уксусный альдегид, который обнаруживается фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором азотнокислого серебра ($AgNO_3$). При нагревании колбы уксусный альдегид будет улетучиваться и, воздействуя на аммиачный раствор серебра, вызовет почернение бумажки.

2. В пробирку наливают 1–2 мл исследуемого фильтрата и прибавляют 5 мл крепкой серной кислоты и 10 капель насыщенного раствора медного купороса. Взболтав жидкость, нагревают ее в течение 5 минут на водяной бане при $100^\circ C$. После охлаждения прибавляют несколько капель 0,1%-го спиртового раствора тиофена. В присутствии молочной кислоты получается вишнево-красное окрашивание.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте молочнокислые бактерии, опишите их особенности, типы брожения.
2. Назовите особенности морфологии клеток молочнокислых бактерий. Как морфология клеток меняется с возрастом культуры?
3. Перечислите представителей типичного и нетипичного молочнокислого брожения.
4. Каким образом можно изучить молочнокислые бактерии в различных продуктах?
5. Заполните таблицу:

Представитель	Характеристика	Рисунок
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>Lactobacillus brevis</i>		

>>

>>

Представитель	Характеристика	Рисунок
<i>Lactobacterium plantarum</i>		
<i>Lactobacterium delbruckii</i>		
<i>Bacterium cucumeris fermentatis</i>		

5.3. Спиртовое брожение

Спиртовое брожение — биохимическая реакция брожения, осуществляемая микроорганизмами, в результате которой углеводороды, преимущественно глюкоза, преобразуются в молекулы этанола и углекислого газа. Реакция происходит в бескислородной среде и является разновидностью клеточного дыхания.

Спиртовое брожение лежит в основе винокурения, виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей теста.

При брожении образуется CO_2 , который увеличивает объем теста при выпечке хлеба. В хлебе появляется пористость.

Впервые дрожжи наблюдал еще А. Левенгук в 1680 г. Но истинную роль дрожжей в спиртовом брожении установил Луи Пастер в 1857 г.

Превращение углеводов в спирт и углекислоту осуществляют одноклеточные грибы дрожжи представители рода *Sacharomyces*, которые принято делить на расы:

- пекарские (*S.cerevisiae*, *S.minor*);
- винные (*S. vini*);
- пивные (*S.carisbergensis*, *S.cerevisiae*)
- спиртовые (*S.cerevisiae*).

Дрожжи винные и пивные вызывают низовое брожение (t — до 15°C) без бурного процесса, дрожжевая клетка находится на дне бродящей жидкости.

Хлебные дрожжи — верховое брожение (t — до 25°C) с образованием пены, с бурным выделением CO_2 . Дрожжевые клетки при этом находятся на поверхности бродящей жидкости.

Сбраживание моно- и дисахаридов происходит по суммарному уравнению:



Наряду с основными продуктами брожения в незначительных количествах образуются побочные продукты: глицерин, уксусный альдегид, уксусная и янтарная кислоты, смесь высших спиртов (сивушные масла). В аэробных условиях дрожжи проводят полное окис-

ление углеводов до CO_2 и H_2O и, таким образом, являются факультативными анаэробами.

Полное окисление сопровождается выделением большого количества энергии и накоплением большой биомассы, что используется человеком для получения кормовых и пекарских дрожжей, различных заквасок и т. п.

Дикие дрожжи встречаются на сочных плодах, листьях и растительных остатках, лесной подстилке и почве. Многие немецкие вина получают в результате брожения, вызываемого дикими дрожжами рода *Kloeckera*. В природе спиртовое брожение обнаружено у бактерий *Sarcina ventriculi* и муковых грибов.

Спиртовое брожение лежит в основе производства этилового спирта, пива, вина, используется в хлебопечении. Совместно с молочнокислым брожением оно используется при производстве кваса, кефира, кумыса. Основными потребителями этилового спирта являются пищевая и химическая промышленность, а также медицина.

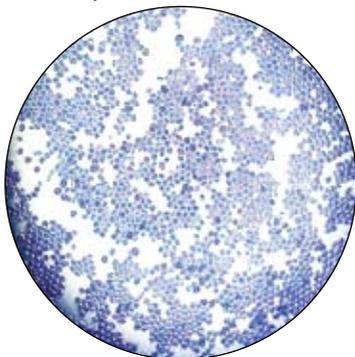


Рисунок 90. Овальные дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, увеличенные в 400 раз [URL: <https://news.mit.edu/2014/yeast-ethanol-biofuel-production-1002>].

Практические задания

1. Изучение дрожжей — возбудителей спиртового брожения

Приготовить препарат из жидкой культуры хлебных дрожжей методом раздавленной капли. Микроскопировать с объективом 40х. Зарисовать почкующиеся дрожжи и подписать латинское название.

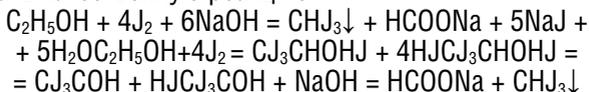
Записать основные стадии химических превращений веществ при спиртовом брожении от глюкозы до этанола, отметив количество молекул АТФ, образовавшихся из одной молекулы глюкозы.

2. Проведение качественной реакции процесса спиртового брожения. Определение этилового спирта

Для изучения процесса спиртового брожения готовят суспензию дрожжей. Для этого в колбу на 250 см³ вносят 20 см³ 10%-го раствора сахарозы и 2 г пекарских дрожжей. Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой и выдерживают 1 час в термостате при 30°C.

К 10 см³ исследуемой суспензии в пробирку добавить 1–2 см³ раствора 10%-го щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения. После этого в пробирку внести несколько кристалликов йода и снова нагреть над пламенем горелки. В присутствии спирта выпадает желтый осадок с характерным запахом.

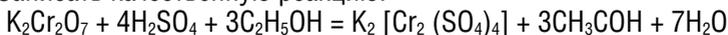
Записать качественную реакцию:



3. Определение уксусного альдегида

В пробирку к 2–3 см³ исследуемой суспензии вносят кристаллик K₂Cr₂O₇ и добавляют 2–3 капли конц. H₂SO₄. Смесь нагревают над пламенем спиртовки. Вследствие восстановления хрома, происходит изменение цвета с оранжевого на зеленый. Выделяющийся уксусный альдегид ощутим по запаху.

Записать качественную реакцию:



Контрольные вопросы

1. Дайте характеристику процессу спиртового брожения и назовите ученого, открывшего этот процесс.
2. Перечислите представителей относящихся к дрожжам. Дайте характеристику верховым и низовым дрожжам.
3. Охарактеризуйте дикие дрожжи.
4. Назовите сферы применения спиртового брожения.

5.4. Маслянокислое брожение

Биохимическая природа маслянокислого брожения была установлена Луи Пастером (1861 г.). Он доказал, что маслянокислое брожение вызывается маслянокислыми бактериями. При этом Пастер открыл новый тип окисления — анаэробный.

Маслянокислое брожение осуществляют в основном облигатно анаэробные, грамположительные, спорообразующие, подвижные, палочковидные бактерии рода *Clostridium*.

Суммарное уравнение брожения следующее:



Типичным представителем маслянокислых бактерий, осуществляющих этот тип брожения является *Clostridium butyricum*— крупная палочка (1–2×10 мкм). Молодые клетки этих бактерий имеют палочковидную форму, затем становятся веретеновидными (кlostридиями), поскольку в клетках формируется спора

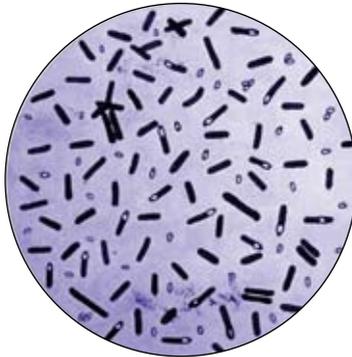


Рисунок 91. Маслянокислые бактерии *Clostridium butyricum*
[URL: <https://www.nal.usda.gov/exhibits/ipd/canning/items/show/118>].

Споры могут располагаться в клетке центрально или чаще субтерминально. Диаметр спор, как правило, больше диаметра клеток. Клетки спорообразующих анаэробов грамположительны, подвижны (перитрихи).

В качестве источника углерода маслянокислые бактерии могут использовать моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), молочную и пировиноградные кислоты, манит, глицерин и ряд других соединений. Источники азота — белки, пептон, аминокислоты, аммиачные соединения и даже молекулярный азот.

Род *Clostridium* имеет патогенные и сапрофитные формы. Сапрофитные маслянокислые бактерии широко распространены в почвах и других естественных субстратах.

Таблица 1 — Сапрофитные и патогенные виды рода *Clostridium*

Сапрофитные маслянокислые бактерии	Патогенные маслянокислые бактерии
<i>Clostridium pasteurianum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>Clostridium felsineum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>

В природе маслянокислое брожение имеет большое значение как звено в цепи превращений соединений углерода. В то же время в ряде производств народного хозяйства маслянокислые бактерии могут наносить значительный ущерб, вызывая вспучивание сыров, прогоркание молока, порчу консервов, силоса, овощей, картофеля и других продуктов.

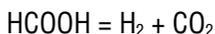
Вместе с тем масляная кислота требуется для некоторых промышленных целей и ее получают на заводах, сбраживая специально подготовленные заторы чистой культурой маслянокислых бактерий. Образовавшуюся кислоту затем отделяют и очищают химическим методом.

Двухфазность брожения характерна для ряда видов, выделяющих наряду с бутиратом и ацетатом такие метаболиты, как бутанол, ацетон, этанол.

Таким образом, *Cl. acetobutylicum* и другие виды, по мнению исследователей этой группы бактерий, нейтрализуют ингибирующее действие бутирата и ацетата на клетки клостридий. Являясь космополитами, клостридии широко распространены в природе и различаются в отношении сбраживаемых субстратов. Их популяции встречаются в почве, придонном иле водоемов, участвуя в расщеплении олиго- и полимеров (крахмала, клетчатки, пектина и т. п.).

Некоторые пептолитические виды могут быть возбудителями раневых инфекций (столбняк *Cl. tetani*, газовая гангрена *Cl. septicum*, *Cl. perfringens* и др.), пищевых отравлений (ботулизм *Cl. botulinum*). Способность клостридий к азотфиксации была обнаружена С. Н. Виноградским (*Cl. pasteurianum*).

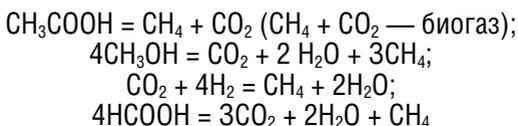
Способность некоторых микроорганизмов выделять при брожении органические кислоты: молочную, янтарную, уксусную, муравьиную и др., называют смешанным или муравьинокислым брожением. Такой способностью обладают и представители семейства *Enterobacteriaceae*. Например, *Escherichia coli* расщепляет пируват с образованием ацетил-СоА и формиата, при этом большинство штаммов кишечной палочки расщепляют муравьиную кислоту:



Описанные выше типы брожения называются первичными, так как организмы используют в качестве субстрата растительные и животные остатки продукты биосинтеза: углеводы, органические спирты, кислоты, аминокислоты, белки и т. д.

При метановом брожении бактерии родов *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* и др. используют продукты брожения других (первичных) анаэробов: CO_2 , H_2 , CH_3COOH и др. Поэтому метановое брожение называют вторичным, трофически тесно связанным с превращением органических веществ в анаэробных условиях.

Суммарные уравнения следующие:



На основании изучения химического состава клеточных стенок, цитоплазматической мембраны, последовательности оснований в 16S рРНК и других признаков, метанообразующие бактерии относят к архебактериям (отдел *Mendosicutes*).

Биогаз и сам метан образуются в торфяниках, на дне водоемов, в затопленных, переувлажненных почвах (рисовые поля), в отстойниках очистных сооружений. Метанообразующие бактерии составляют последнее звено анаэробной пищевой цепи, в начале которой находятся углеводы, белки, липиды. Образующийся метан используется человеком как топливо, а сам процесс брожения оценивается как способ получения возобновляемого источника энергии метана.

В заключение следует отметить, что выход энергии при протекании различных типов брожения небольшой (две молекулы АТФ) по сравнению с дыханием и анаэробным дыханием (до 38 молекул АТФ на одну молекулу окисленной глюкозы).

Практические задания

1. Изучение культуры маслянокислого брожения крахмала

Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода *Clostridium*. За неделю-полторы до занятия закладывают опыт. Для этого неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками, которыми заполняют пробирку на 1/3 объема, добавляют щепотку мела и заполняют водой почти доверху. Пробирки помещают в водяную баню при температуре

80°C на 10–15 мин., затем закрывают пробками и ставят в термостат с температурой 35°C. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспорные формы других видов убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

Другой способ получения культуры маслянокислых бактерий: 5 г ячменя (солода), 2 г мела, 5 г сахара — всё заливают водой (100 мл) и кипятят в течение 5 минут. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, на дно которой бросают кусочек почвы или семени гороха. Пробирку держат в термостате при 30–35°C семь дней. На следующем занятии производят микроскопирование жидкости, в которой обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры.

Clostridium pasteurianum — свободноживущий анаэробный азотфиксатор, обитающий в почве. В клетках этих бактерий содержится гранулеза, которая окрашивается раствором Люголя в синий цвет. Ее можно видеть при микроскопировании живых бактерий в капле суспензии культуральной жидкости с добавкой реактива методом раздавленной капли с масляной иммерсией. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой. С культуральной жидкостью проводят качественные реакции на масляную кислоту

Опишите внешний вид культуры (цвет, наличие пены, запах, состояние кусочков картофеля), объясните причины изменения признаков культуры. В пробирку отлить 2–3 мл жидкости культуры, добавить к ней 1 мл 5%-го раствора хлорида железа и нагреть в пламени спиртовки. Появление буровато-коричневой окраски указывает на наличие маслянокислого железа, которое образовалось при реакции масляной кислоты с хлоридом железа.

— записать результаты реакции и сделать вывод о наличии масляной кислоты;

— записать основные стадии превращения веществ при маслянокислом брожении от глюкозы до конечных продуктов брожения.

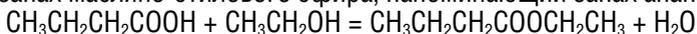
Пипеткой взять культуру из нижней части пробирки, поместить каплю этой культуры на предметное стекло и добавить к ней каплю слабого раствора Люголя. Накрывать каплю покровным стеклом и рассмотреть с объективом БИ-40.

— зарисовать вегетативные и спорные клетки, отметить гранулезу, споры;

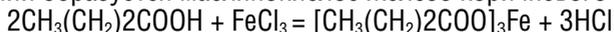
— подписать латинское название бактерии, тип спорообразования, отношение к кислороду, тип азотного питания;

— проделать качественные реакции:

А. К 3–4 мл жидкости в пробирку добавить 0,5 мл 95%-го спирта и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взболтать и нагреть. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этилового эфира, напоминающий запах ананаса:



Б. К 5 мл исследуемой жидкости добавить 2 мл 5%-го FeCl_3 . При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета:



2. Изучение культуры и бактерии маслянокислого брожения клетчатки

В большую пробирку на дно положить 3–4 кусочка фильтровальной бумаги и налить среду следующего состава: на 100 мл водопроводной воды фосфорно-кислый аммоний однозамещенный — 0,1 г; хлористый кальций — 0,03 г, углекислый кальций (мел) — 0,5 г, сернокислый магний кристаллический — 0,05 г, железо хлорное — 2 капли; 1%-го раствора пептона — 0,1 г. Среда в пробирке не должна доходить до края пробки на 1–1,5 см. В пробирку опустить небольшой комочек почвы и закрыть пробкой. На водяной бане культуру прокипятить в течение 10 минут, затем пробку обернуть полиэтиленовой пленкой, закрепив ее резиновым колечком или ниткой. Культуру подписать и поставить на 2–3 недели в термостат с температурой 30–35°C.

Описать внешний вид культуры, состояние фильтровальной бумаги, наличие на ней колоний. Часть разложившейся бумаги перенести на предметное стекло, приготовить мазок, фиксировать его в пламени спиртовки и окрасить фуксином Циля или генцианвиолетом. Готовый препарат рассмотреть с объективом МИ-90, зарисовать вегетативные и спороносные клетки, подписать название бактерии, тип спорообразования. Записать основные стадии брожения клетчатки.

3. Изучение культуры маслянокислого брожения пектиновых веществ

Из стеблей льна (или конопля) приготовить снопик длиной 3–4 см, вложить стеклянную палочку и обвязать ниткой в двух местах. Снопик опустить в тонкостенный стакан, залить водой и кипятить на плитке для удаления растворимых веществ в течение 10 минут. Затем сно-

пик перенести в пробирку, залить водой на 3/4 ее высоты, добавить щепотку мела и прокипятить 2 минуты.

После кипячения снопик извлечь, вставить в него небольшой кусочек стебля льна (конопли) и снова опустить в пробирку. Пробирку, закрытую ватной пробкой, подписать и поставить в термостат с температурой 25–30°C на 2–3 недели. Объясните, зачем в снопик вставляется стеклянная палочка, зачем снопик нужно кипятить вначале 10 минут, а затем 2 минуты.

Описать внешний вид культуры и состояние соломки льна. С жидкостью культуры провести качественную реакцию с хлоридом железа (3) на присутствие масляной кислоты. Записать результаты определения. Записать основные стадии маслянокислого брожения пектиновых веществ.

Изучение бактерий маслянокислого брожения пектиновых веществ. Извлечь из снопики 2–3 стебля льна, отжать из них каплю культуры на предметное стекло, поскоблить стебли льна препаровальной иглой. К полученной капле добавить каплю раствора Люголя, накрыть покровным стеклом и микроскопировать с объективом ВИ-40. Зарисовать бактерии брожения пектиновых веществ со спорами и гранулезой, подписать их названия, тип спорообразования.

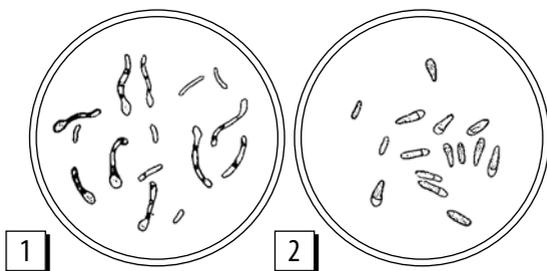


Рисунок 92. Возбудители маслянокислого брожения пектиновых веществ: 1 — *Clostridium pectinovorum*, 2 — *Clostridium felsineum*

[URL: <https://www.spec-kniga.ru/tehnohimicheski-kontrol/osnovy-mikrobiologicheskogo-kontrolya-konservnogo-proizvodstva/vazhnejshie-biohimicheskie-processy-vozbuzhdaemye-mikroorganizmami-brozhenie-pektinovyh-veshchestv.shtml>].

Контрольные вопросы

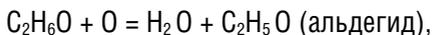
1. Кем установлена природа маслянокислого брожения, в чем она заключается?

2. Какие микроорганизмы осуществляют в основном масляно-кислое брожение?
3. Назовите практическое применение маслянокислых бактерий?
4. Опишите один из методов изучения МКБ.
5. Какие основные характеристики имеют бактерии рода *Clostridium*?

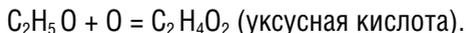
5.5. Уксуснокислое брожение

Уксуснокислое брожение представляет собой процесс превращения этилового спирта при участии кислорода в уксусную кислоту.

Процесс уксуснокислого брожения протекает в два этапа. Сначала этиловый спирт окисляется до уксусного альдегида:



а затем уксусный, альдегид в результате дальнейшего окисления превращается в уксусную кислоту:



Если оставить на воздухе сосуд со слабым спиртовым раствором, например, пивом, вином и т.п., то по прошествии некоторого времени на поверхности жидкости появляется пленка, спирт исчезает и накапливается уксусная кислота. Появившаяся пленка и есть возбудительница уксусного брожения.

Первое исследование, предпринятое для выяснения вопроса о природе этой пленки, принадлежит Персону (1822 г.), также исследовали это явление известные немецкие биологи Фридрих Кютцинг и Майер, датский ученый Ганзен и другие.

Вызывают процесс уксусного брожения уксуснокислые бактерии, они достаточно широко распространены в природе, встречаются на растениях, ягодах, фруктах, часто совместно с дрожжами в квашеных овощах, в почве, в меде, вине, пиве, на зерне и даже на пчелах. Оптимальная температура развития $+20^{\circ} \dots +34^{\circ}C$.

Уксуснокислые бактерии — аэробные бактерии, способные образовывать уксусную кислоту из одно- и многоатомных спиртов и развиваться в кислой среде, то есть отличаются высокой степенью устойчивости к кислотам, некоторые способны проявлять жизнедеятельность при содержании в среде до 7–11% уксусной кислоты; нуждаются в питательных средах сложного состава. Они являются грамотрицательными палочковидными, слабоподвижными или неподвижными бактериями.

Типичные представители — бактерии рода *Acetobacter* и *Gluconobacter*.

Важными представителями этой группы являются уксусная палочка, способная накапливать в среде до 6% кислоты, орлеанская уксуснокислая палочка, накапливающая до 9,5% кислоты и хорошо развивающаяся на слабом вине, а потому используемая для промышленного получения винного уксуса, а также палочка Шютценбаха, которая образует сплошную поверхностную пленку и накапливает до 11,5% уксусной кислоты.

Для промышленного получения пищевого уксуса слабый спиртовой раствор сбраживают чистыми культурами в условиях с принудительной аэрацией. Процесс отбора готовой продукции (столового уксуса) ведется непрерывно. Реже пользуются старинным способом получения в открытых чанах разбавленного столового вина для получения так называемого винного уксуса.

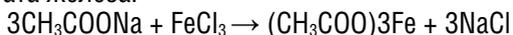
Уксуснокислые бактерии способны сбраживать не только этиловый спирт, но и другие первичные спирты, превращая их в соответствующие кислоты. Они могут также окислять вторичные спирты в кетоны. Например, молочная кислота окисляется в пировиноградную, являющуюся кетоникислотой. Попадая на различные товары, уксуснокислые бактерии могут вызывать их порчу — скисание вина, пива. Они являются вредителями спиртового, дрожжевого, хлебопечкарного и других производств.

Практические задания

Изучение уксуснокислых бактерий

За неделю-полторы до занятия в конические колбы наливают тонкий слой пива (1 см). Толщина слоя пива имеет большое значение для исхода опыта, так как для уксуснокислых бактерий должны быть созданы аэробные условия. К пиву добавляют немного (0,5 мл) спирта. Колбы закрывают ватными тампонами и ставят в термостат при температуре 30–35°C на несколько суток.

Содержимое колб анализируют, описывают характер образовавшихся пленок, микроскопируют окрашенные мазки, делают качественную реакцию на CH_3COOH . Для этого к 5 мл скисшего пива в пробирку добавляют 2 мл 10%-го раствора соды и немного хлорного железа (3) той же концентрации. Смесь нагревают. При наличии уксусной кислоты появляется красное окрашивание вследствие образования ацетата железа:



В колбе с культурой уксуснокислых бактерий определить и записать тип пленки (гладкая слизистая, сухая морщинистая, толстая слизистая). Затем на предметное стекло поместить каплю раствора Люголя и перенести в нее кусочек пленки, накрыть покровным стеклом и микроскопировать.

Зарисовать нормальные и инволюционные формы клеток уксуснокислых бактерий, записать их цвет. По форме клеток и окраске их от йода, консистенции пленки определить и записать вид бактерии.

Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. На поверхности растворов бактерии образуют пленки, состоящие из полисахаридов. Типовой вид *Acetobacter aceti* представлен слабоподвижными палочковидными эллиптическими клетками, одиночными, в парах или цепочках с размерами 0,6–0,8 x 1–3 мкм.

Это бесспорные грамотрицательные палочки, облигатные аэробы, они растут и размножаются на поверхности питательных сред, образуя тонкие пленки. Нередко образуют инволюционные формы в виде раздутых, разветвленных или нитевидных образований.

Acetobacter aceti образует гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода. Палочка активно развивается при температуре около 34°C, выносит концентрацию уксусной кислоты до 6%.

Acetobacter xylinum образует в культуре грубую, морщинистую, слизистую пленку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии живут в пленке чайного гриба, в сообществе с дрожжами. Такой симбиоз взаимовыгоден: дрожжи сбраживают сахар до спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологически близка к *Ac. aceti*. Развивается на алкогольных напитках.



Рисунок 93. *Acetobacter aceti* [URL: <https://www.spec-kniga.ru/tehnohimicheski-kontrol/osnovy-mikrobiologicheskogo-kontrolya-konservnogo-proizvodstva/vazhnejshie-biohimicheskie-processy-vozbuzhdaemye-mikroorganizmami-uksusnokisloe-brozhenie.shtml>].

Контрольные вопросы

1. Назовите два этапа процесса превращения этилового спирта при участии кислорода в уксусную кислоту?
2. Дайте характеристику уксуснокислым бактериям.
3. Назовите практическое применение уксуснокислых бактерий?



Тема 6

Микрофлора воздуха, почвы и воды

6.1. Изучение микрофлоры воздуха

Воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться. В воздухе нет питательных веществ, недостаточно воды, оказывают бактерицидное действие на микробы солнечные лучи.

Микрофлору воздуха подразделяют на:

— **постоянную**, т. е. более часто обнаруживаемую в воздухе (пигментные кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов, дрожжеподобные грибы и др.);

— **временную**, находящуюся в воздухе не всегда и менее стойкую к воздействию различных факторов окружающей среды.

Болезнетворные микробы попадают в воздух из почвы и с выделениями больных людей и животных. В основном контаминация воздуха микроорганизмами происходит капельным путем — при кашле, чихании, фыркании.

Показателем загрязнения воздуха в помещениях являются *стрептококки, стафилококки, кишечные палочки*, которые могут длительное время удерживаться в воздухе во взвешенном состоянии и переноситься совместно с другими микроорганизмами в виде аэрозоля.

Выживаемость патогенных микроорганизмов, находящихся в каплях, пыли, зависит от биологических свойств возбудителя, а также температуры и влажности воздуха.

Например, возбудители туберкулеза, стафилококкоза, сибирской язвы, хорошо переносящие высыхание, длительное время сохраняются в бактериальной пыли.

Микробиологическое исследование воздуха проводят для определения общего количества микроорганизмов (микробного числа) и количества санитарно-показательных микроорганизмов.

Общее число микроорганизмов в воздухе определяют при посеве на МПА; санитарно-показательных микробов — на кровяном агаре, желточно-солевом или кровяно-солевом агаре. В случае необходимости исследуют на наличие спор, плесеней и дрожжей — на сусло-

агаре или среде Сабуро; протеолетических бактерий — на МПЖ или молочном агаре.

Отбор проб воздуха и техника посева. Существует много методов отбора проб воздуха для исследования: осаждение микроорганизмов под влиянием гравитационных сил или седиментационный метод по Коху; принудительное осаждение микробов с помощью ударного действия струи воздуха (метод Кротова); фильтрации воздуха через жидкость; фильтрации воздуха через твердые растворимые и нерастворимые фильтры.

Фильтрационные методы основаны на аспирации (продувании) воздуха через твердые растворимые, твердые нерастворимые и жидкие фильтры, которые затем исследуют.

Для аспирации воздуха через фильтры применяют прибор Дьяконова. В качестве твердых нерастворимых фильтров используют мембранные фильтры и бактериоуловители Киктенко и Речменского.

Наиболее доступными и чаще применяемыми являются методы Коха и Кротова.

Седиментационный метод по Коху или чашечный метод. Осаждение микробных частиц и капель происходит под действием силы тяжести и нисходящих потоков воздуха на поверхность плотной среды в открытых чашках Петри, которые оставляют открытыми на 5, 10, 15 и более минут в зависимости от предполагаемой загрязненности воздуха.

Посевы на чашках с МПА и кровяным агаром культивируют при 30–37°C в течение 48 часов, на среде Сабуро — при комнатной температуре (20–22°C) в течение четырех суток или при 30°C в течение 72 ч, а затем проводят подсчет числа выросших колоний.

При определении микробного числа на МПА подсчитывают колонии по всей чашке, если их выросло немного (менее 300); при большом числе колоний подсчет производят по секторам или с помощью приборов.

После подсчета выросших колоний микроорганизмов определяют их количество в 1 м³ воздуха по формуле Омелянского, согласно которой на площадь чашки с питательной средой 100 см² в течение 5 минут оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха.

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot T},$$

где X — количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха;

a — количество выросших колоний в чашках;

b — площадь чашки (80 см²);

5 — время по правилу Омелянского;

T — время, в течение которого чашка была открыта;

10 — объем воздуха в литрах (1 м³).

Изучение микрофлоры воздуха

Чашку Петри с застывшей пластинкой из питательной среды поставить в исследуемом помещении на горизонтальную поверхность, снять крышку и поставить рядом с дном чашки. Через 10 минут чашку закрыть и подписать. Чашку поставить в термостат с температурой 25–28 °С крышкой вниз. Через 3–7 суток, не открывая чашку, подсчитать со стороны дна выросшие на агаре колонии, в т. ч. мелкие. После подсчета колоний чашки оставить на полке в лаборатории крышками вниз.

В тетради записать, в каком помещении проводился учет микроорганизмов воздуха, время экспозиции при посеве, количество колоний в чашке через 3 суток и через 7 суток после посева.

Определение количества микроорганизмов в воздухе. В чашке Петри с посевом из воздуха подсчитать количество колоний, учтенных в этой же чашке через 3–7 суток после посева. Для дальнейших расчетов использовать большее число колоний из двух сроков учета.

Принимается (по Омелянскому), что на площади в 100 см² в течение 5 минут оседает столько клеток микроорганизмов, сколько их содержится в 10 л воздуха. Для пересчета на 100 см² нужно измерить диаметр агаровой пластинки в чашке, найти радиус и площадь по формуле площади круга. Количество микроорганизмов в 10 л воздуха будет равно: $A \cdot (100 : c)$, где A — количество колоний в чашке, c — площадь чашки в квадратных сантиметрах. Количество колоний в оба срока, диаметр чашки и расчеты количества микроорганизмов в воздухе записать в тетрадь.

Необходимо выделить чистую культуру и заложить опыт. Через 3–7 суток описать колонию, из которой выделена чистая культура, по схеме, указанной выше.

Контрольные вопросы

1. Как подразделяют воздушную среду по наличию в ней микроорганизмов?
2. С какой целью, и какими способами оценивают микрофлору воздуха?
3. Назовите основные методы исследования воздушной среды на наличие в ней микроорганизмов.
4. Какой формулой руководствуются при подсчете микроорганизмов в воздухе?

6.2. Изучение микрофлоры почвы

Почва является естественной средой обитания микроорганизмов. В ней имеются все условия для благоприятного их развития (достаточное количество влаги, органических и минеральных веществ). Из природных субстратов почва обильно заселена микроорганизмами, которые составляют ее постоянную микрофлору. Санитарно-гигиеническая роль этой микрофлоры огромна. Почвенные микроорганизмы участвуют в минерализации органических отходов, самоочищении почвы, в круговороте веществ в природе.

В почву могут попадать патогенные микроорганизмы со сточными водами, с трупами людей и животных. В связи с этим почва может служить источником распространения возбудителей инфекционных болезней, через почву загрязняются объекты окружающей среды, может происходить обсеменение сапрофитными и болезнетворными микроорганизмами сырья, пищевых продуктов, кормов.

Количественный и видовой состав микроорганизмов в почве обусловлен содержанием в ней органических веществ, влаги, pH, температурой, климатическими условиями и т. д.

В составе микрофлоры почвы принято выделять так называемые физиологические группы микроорганизмов, которые участвуют в различных процессах и на разных этапах постепенного разложения органических веществ, к которым относятся:

1. *Аммонофикаторы (гнилостные).*
2. *Нитрифицирующие бактерии.*
3. *Азотфиксирующие.*
4. *Бактерии, расщепляющие клетчатку, а также вызывающие различные брожения (молочнокислое, спиртовое, маслянокислое и др.).*
5. *Бактерии, участвующие в круговороте серы, железа, фосфора других элементов.*

В почве могут присутствовать и патогенные бактерии, продолжительность их выживаемости зависит от вида и условий внешней среды.

Неспорообразующие патогенные бактерии и вирусы погибают в ней в течение нескольких суток или месяцев, в частности возбудитель туберкулеза в почве сохраняется до одного года.

Особое место занимают возбудители почвенных инфекций (сибирской язвы, эмфизематозного карбункула, столбняка, ботулизма), которые образуют споры и сохраняются в почве годами, а возбудитель сибирской язвы — десятки лет.

Краткий санитарно-бактериологический анализ почвы включает определение двух показателей: общего количества микробов (в 1 г почвы) и коли-титра.

В отдельных случаях в почве определяют возбудителей сибирской язвы, столбняка, ботулизма.

Отбор проб почвы. На обследуемой территории до 1000 м выделяют два участка по 25 м² каждый: один участок выбирают вблизи, другой — вдали от источника загрязнения. С каждого участка отбирают среднюю пробу, составленную из пяти образцов, взятых по диагонали или в четырех точках по краям и в одной в центре. Образцы берут на глубине до 20 см, при исследовании почвы скотомогильников — ниже глубины захоронения не менее чем на 25 см. Пробы отбирают стерильной железной лопаткой, совком или специальным буром в стерильные широкогорлые банки, которые закрывают ватными пробками. К банке приклеивают этикетку с датой и номером отобранной почвы.

Масса каждого образца должна быть 200–300 г, а смешанного — не менее 1 кг. Отобранные пробы почвы направляют в лабораторию и исследуют сразу же или не позднее чем через 12–18 ч при хранении при 1–5°C.

В колбу на 500 мл, наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят 30 г исследуемой почвы. Колбу с содержимым встряхивают в течение 10 минут. Из полученного разведения почвы 1:10⁻¹ готовят десятикратные разведения: для чистых почв 1:10⁻² до 1:10⁻⁴, для загрязненных — до 1:10⁻⁶ и больше.

Определение общего микробного числа (ОМЧ). Из последних 3–4 пробирок приготовленных разведений берут 1 мл и переносят в стерильные чашки Петри (не менее двух чашек на каждое разведение). В эти чашки заливают по 10 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА и тщательно перемешивают. Посевы культивируют в термостате при 37°C в течение 24–48 часов.

Учет результатов проводят путем подсчета выросших колоний и определения среднеарифметического числа. Полученное число колоний умножают на степень разведения исследуемой почвы, получая число бактерий в 1 г почвы.

Определение коли-титра почвы методом бродильных проб с использованием среды Кесслера. Исследования проводят в три этапа. На первом этапе готовят разведения: для чистых почв от 1:10⁻¹ до 1:10⁻³; для загрязненных — от 1:10⁻³ до 1:10⁻⁶. После тщательного перемешивания 1 мл полученной суспензии из различных разведений переносят в пробирку с 9 мл среды Кесслера (на 1 л дистиллированной воды 10 г пептона, 50 мл бычьей желчи, 2,5 г лактозы, 4 мл 1%-го водного раствора генцианвиолета). Посевы культивируют при 43°C в течение 48 часов.

На втором этапе исследования просматривают посевы на среде Кесслера. Из пробирок с наличием газа продолжают высеивать на среду Эндо. Посевы культивируют при 37°C в течение 24 часов.

На третьем этапе исследуют колонии, выросшие на среде Эндо. Отбирают колонии, типичные для бактерий группы кишечных палочек, готовят из них мазки, красят по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках коротких полиморфных грамтрицательных палочек производят высеивание из этих колоний на среду Кесслера для подтверждения газообразования в чистой культуре.

Таблица 2 — Санитарно-бактериологические показатели почвы

Оценка почвы	Общее количество бактерий в 1 г	Коли-титр
Относительно чистая	Менее 10 тыс.	Выше 1,0
Умеренно загрязненная	Сотни тысяч	1 – 0,01
Сильно загрязненная	Миллионы	0,01 – 0,001

Практические задания

1. Изучение микрофлоры почвы

Так как почва населена микроорганизмами очень обильно, то для получения на питательной пластине изолированных колоний необходимо для посева приготовить почвенную суспензию с разведением в десятки и сотни тысяч раз.

Приготовление почвенной суспензии с разведением 1/100000 проводится следующим путем:

На стерильном часовом стекле отвесить 1 г почвы, перенести навеску в стерильную колбу объемом 150–200 мл. В колбу влить 99 мл стерильной воды и взбалтывать смесь в течение 5 минут, не допуская смачивания пробки. Три стерильные пробирки пронумеровать и влить в каждую по 9 мл стерильной воды. После окончания взбалтывания из колбы взять стерильной пипеткой 1 мл суспензии и перенести в пробирку № 1, размешать этой пипеткой полученную смесь. Другой стерильной пипеткой перенести 1 мл суспензии из пробирки № 1 в пробирку № 2 и тоже размешать. Стерильной пипеткой из пробирки № 2 перенести 1 мл суспензии в пробирку № 3. Таким образом, будут получены почвенные суспензии с разведением в колбе 1/100 в пробирках 1/1000, 1/10000, 1/100000.

Посев. Из пробирки с разведением 1/100000 стерильной пипеткой взять 0,1 мл суспензии и вылить в чашку Петри с пластиной СА. Приоткрыв крышку чашки с одной края, стерильным шпателем

тщательно втереть суспензию в питательную пластину. Чашку закрыть, подписать и поставить вверх дном в термостат с температурой 25–28°C. Через три дня подсчитать количество выросших колоний, а чашку оставить лаборатории до следующего занятия.

В тетради записать схему разведения почвы, концентрацию и объем почвенной суспензии, использованной для посева, а также количество колоний, выросших через 3–7 суток после посева.

Определение количества микроорганизмов в 1 г почвы. Подсчитать количество колоний в ашке Петри с посевом из почвы. При большом количестве колоний чернилами разделить дно чашки на 4–8 секторов и подсчет вести по секторам. Расчет количества колоний в 1 г почвы провести по формуле:

$$A = a / b \cdot v,$$

где *a* — количество колоний в чашке (наибольшее из двух сроков учета);
b — разведение суспензии почвы, *v* — объем суспензии в миллилитрах, высеянный в чашку.

Записать число колоний в чашке в оба срока учета и расчет по формуле. Записать количество микроорганизмов в 1 г почвы, найденное другими звеньями, и найти среднее значение.

Выделить чистую культуру и заложить опыт. Через 3–7 суток описать колонию, из которой выделена чистая культура, по схеме, указанной выше.

2. Изучение культуры бактерий-денитрификаторов

Денитрифицирующие бактерии — бактерии, восстанавливающие нитраты до молекулярного азота. К ним относятся представители более 150 видов из 50 родов. Типичными денитрифицирующими бактериями являются представители родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* и *Micrococcus*.

С помощью реактива Несслера определить наличие в культуре ионов аммония. Для этого 2–3 капли культуры поместить в лунку фарфоровой пластинки и добавить в нее каплю реактива Несслера. В присутствии ионов аммония жидкость окрасится в желтый цвет или выпадет коричневый осадок. Затем провести реакцию по обнаружению ионов азотистой и азотной кислот. В лунку фарфоровой пластинки поместить 1–2 капли концентрированной серной кислоты, 1 кристалл дефиниламина, а после его растворения — каплю культуры. При наличии нитратов или нитритов капля окрасится в синий цвет.

По результатам анализа определить, какие азотосодержащие вещества находятся в культуре и сравнить с веществами в среде, которая использовалась для постановки культуры.

Произошло ли изменение этих веществ? Записать, основные стадии превращения веществ в процессе денитрификации, отметив стадии, на которых идет восстановление азота и образование АТФ.

Описать культуру этих бактерий (наличие пены, прозрачность, цвет).

Изучение бактерий-денитрификаторов. Из нижней части пробирки взять пипеткой культуру и приготовить из нее мазок. После фиксирования в пламени спиртовки окрасить фуксином мазок рассмотреть с объективом МП-90. Зарисовать бактерии-денитрификаторы и подписать их название. Отметить роль их в природе и в сельском хозяйстве.

3. Изучение культуры бактерий-аммонификаторов

Аммонифицирующие микроорганизмы — это гнилостные бактерии. Наиболее известные среди них — бактерии родов *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus Mycoides*) и *Clostridium* (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus Histolyticum*, *Clostridium Putrificum*), а также бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*Proteus*, *Escherichia coli*).

Постановка культуры. 2%-ю пептоновую воду налить в пробирку на 3/4 ее высоты, опустить комочек почвы размером с пшеничное зерно. Под ватную пробку вставить две полоски бумаги, смоченные дистиллированной водой: одну красную лакмусовую. Бумагу и вторую — пропитанную 10%-м раствором ацетата свинца. Бумажки не должны касаться среды. Ватную пробку обернуть полиэтиленовой пленкой и закрепить пленку резиновым колечком или ниткой. Пробирку подписать и поставить в термостат с температурой 25–30°C на 7 суток.

Изучение накопительной культуры аммонификаторов. Описать внешний вид культуры (прозрачность, цвет, запах, наличие пены) и изменение цвета лакмусовой бумаги и бумаги, пропитанной ацетатом свинца. Сделать вывод о причинах изменения признаков культуры и цвета индикаторных бумаг.

Изучение бактерий — аммонификаторов белка. Из средней части культуры аммонификаторов с помощью пипетки взять жидкость, приготовить тонкий мазок, зафиксировать в пламени спиртовки, окрасить фуксином и микроскопировать с объективом МИ-90.

На препарате найдите основные виды аэробных, факультативно анаэробных и в аэробных бактерий, зарисуйте их вегетативные клетки и клетки со спорами, подпишите их названия и группу по отношению к кислороду.

4. Изучение культуры свободноживущих азотфиксирующих бактерий

Азотфиксирующие бактерии — это прокариотические микроорганизмы, способные преобразовывать газообразный азот из атмосферы в соединения фиксированного азота, такие как аммиак, которые могут быть использованы растениями.

1. *Симбиотические, или мутуалистические.* Обитают в корневых клубеньках определённых растений. Например, *Rhizobium*, который ассоциирован с растениями семейства гороховых, и различные виды *Azospirillum*, которые ассоциированы со злаковыми травами.

2. *Свободноживущие.* Не нуждаются в хозяине. Они обычно встречаются в почве или в водной среде. Например, цианобактерии *Anabaena* и *Nostoc*, а также такие роды, как *Azotobacter*, *Beijerinckia* и *Clostridium*.

Описать внешний вид культуры (наличие пены, пленки, цвет пленки, прозрачность среды, запах). Провести реакцию на обнаружение масляной кислоты в среде с помощью хлорида железа. Для этого в пробирку перенести пипеткой 3 мл среды, добавить 1 мл 1%-го раствора хлорида железа и нагреть на пламени спиртовки до кипения. При наличии масляной кислоты раствор окрасится от маслянокислого железа в коричневый цвет. Объясните, какие бактерии могли образовать пленку, чем вызвано появление в культуре пены и масляной кислоты.

Изучение свободноживущих азотфиксирующих бактерий:

а) из нижней части культуры стеклянной трубкой или пипеткой взять каплю и поместить ее на предметное стекло, добавить к ней каплю раствора Люголя и накрыть покровным стеклом. С объективом 40× найти и зарисовать клетки, частично окрашенные в синий цвет, и клетки со спорами, подписать их название, указать тип энергетического обмена и отношение к кислороду.

б) на предметное стекло поместить каплю туши и петлей перенести в нее часть пленки с поверхности культуры, перемешать и накрыть покровным стеклом, излишек туши удалить фильтровальной бумагой. Микроскопировать с объективом 40×. Зарисовать клетки с капсулами, отметить протопласт и капсулу, подписать название вида, отношение к кислороду и тип энергетического обмена.

Количественный учет азобактера в почве. В чашке Петри с посевом комочков почвы на агаризованную среду Эшби подсчитать количество комочков, вокруг которых образовались слизистые колонии. Найти процентное отношение таких комочков к общему числу высеянных комочков почвы, т. е. найти относительный показатель обеспеченности почвы азотобактером.

Описать колонии азотобактера по схеме, приведенной раньше.

5. Изучение микроорганизмов аэробно разложения клетчатки

Аэробное разложение клетчатки происходит под действием различных грибов — паразитов и сапрофитов, а также аэробных бактерий и лучистых грибов (актиномицетов).

В этом процессе принимают участие плесени из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis*. Из аэробных бактерий наибольшее значение имеет *цитофага*, изученная С. Н. Виноградским.

В чашку Петри положить почву, увлажненную до полной влагоемкости, разровнять и слетка утрамбовать шпателем. На поверхность почвы положить кружок фильтровальной бумаги, прогладить его шпателем закрыть чашку и подписать. Чашу поставить во влажную камеру, а последнюю в термостат с температурой 25–27°C на 5–7 суток.

В опыте выделения микроорганизмов аэробного разложения клетчатки описать состояние фильтровальной бумаги и колонии, выросшие в ней. Сделайте соскобы колоний на предметном стекле и приготовьте фиксированный окрашенный фуксином препарат. Препарат изучите с объективом МИ-90, определите имеющиеся роды бактерий и грибов, зарисуйте их и подпишите латинские названия. Запишите основные стадии аэробного разложения клетчатки и дыхания. Отметьте, какую функцию выполняет кислород в процессе дыхания.

6. Изучение клубеньковых бактерий

Клубеньковые бактерии — группа бактерий порядка *Rhizobiales*, способных связывать неорганический атмосферный азот, продуцируя органические азотсодержащие вещества. Клубеньковые бактерии, обитающие в корнях бобовых растений, являются их симбионтами. Способны образовывать особые формы — бактериоиды.

На отмытых корнях клевера или другого растения из семейства бобовых найдите клубеньки. Зарисовать часть корня с клубеньками. Отделите хорошо развитый клубенек от корня, положите его на чистое предметное стекло, разрушите его иглами, отожмите сок. Удалите со стекла остатки клубенька, добавьте каплю дистиллированной воды и сделайте мазок. Мазок подсушите, зафиксируйте в пламени спиртовки и окрасьте метиленовой синькой. С объективом МИ-90 найдите бактериоиды клубеньковых бактерий, зарисуйте их, подпишите название вида, отметить тип питания этого вида.

Контрольные вопросы

1. По каким характеристикам почва является естественной средой обитания микроорганизмов, назовите?
2. Какие основные группы микроорганизмов выделяют в микрофлоре почвы?
3. Как производят отбор проб почвы?
4. Как произвести посев и определение микроорганизмов в 1 грамме почвы?
5. Какие микроорганизмы почвы участвуют в разложении клетчатки, амонификации, денитрификации и азотфиксации?

6.3. Изучение микрофлоры воды

Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов. Особую опасность для здоровья человека и животных представляют патогенные бактерии, которые могут попадать в питьевую воду.

Источниками загрязнения воды патогенными микроорганизмами являются выделения больных и людей, трупы животных, сточные воды (особенно предприятий, перерабатывающих животное сырье) и др. Длительность выживания патогенных микробов в воде зависит от их свойств, времени года, наличия питательных веществ и может составлять от нескольких часов до нескольких лет. Так, возбудитель сибирской язвы может сохраняться в воде до 3 лет, бруцеллы — до 100 дней, возбудитель туберкулеза — до 1 года.

Имеется группа болезней, для которых характерен водный путь распространения (паратифы, лептоспирозы и др.).

Таким образом, вода может стать источником распространения инфекционных болезней и возникновения эпизоотии.

Для санитарно-бактериологической оценки воды проводят следующие исследования:

- 1) *определение общего количества микробов (ОМЧ);*
- 2) *определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ);*
- 3) *обнаружение в воде патогенных микроорганизмов.*

При санитарно-бактериологических исследованиях пробы воды забирают не менее 0,5 л. Из открытых водоисточников пробу отбирают батометром (см. рис. 52). Батометр — стерильная емкость с пробкой, в металлическом каркасе и свинцовым грузилом. На нужной глубине пробку открывают, потягивая ее за веревочку. После поднятия батометра пробку заменяют на ватную. Воду из рек, озер отбирают с глубины 10–15 см от поверхности, а при небольшой глубине — на расстоянии 10–15 см от дна.

Для отбора проб воды из кранов водопровода используют стерильные колбы на 0,5 л с ватной пробкой. Кран перед забором пробы стерилизуют обжиганием горящим спиртовым тампоном, затем в течение 10 минут спускают воду при полном открытии крана. Пробы воды исследуют тотчас же или не позднее 2 часов с момента взятия. Если это невозможно, то хранят не более 6 часов при 1–5 °С.

Практические задания

1. Определение общего количества микробов (ОМЧ) в воде

При определении ОМЧ в водопроводной воде производят посев без разведения, внося 1 мл ее в стерильную чашку Петри. При исследовании воды открытых водоемов и сточных вод предварительно разводят стерильной водопроводной водой в зависимости от предполагаемого загрязнения: от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-4}$, так же вносят из последних разведений по 1 мл в стерильные чашки Петри.

Посевной материал заливают расплавленным и охлажденным до 45°С МПА и после застывания инкубируют в термостате при 37°С в течение 24 часов. После этого срока проводится подсчет выросших колоний и методом расчета определяется общее количество микробов в 1 мл исследуемой воды

2. Определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ) воды

Коли-титром воды называют наименьший ее объем, в котором обнаружены бактерии группы кишечной палочки (БГКП).

Коли-индекс показывает число БГКП в 1 литре воды.

Показатель БГКП указывает на санитарное состояние воды, пригодной в качестве питьевой. Это показатель калового загрязнения воды, так как эти бактерии попадают в воду с калом животных и человека. При большом содержании БГКП в воде создается потенциальная угроза попадания в нее и патогенных бактерий, которые могут вызвать у человека и животных инфекционные болезни.

Определение БГКП осуществляется двумя методами:

1. Метод бродильных проб.
2. Метод мембранных фильтров.

Метод бродильных проб. Этот метод основан на определении сахаролитической активности БГКП. Исследуемая вода в определенных объемах засеивается на глюкозо-пептонную среду (ГПС) или лактозо-пептонную среду (ЛПС) с поплавками и индикатором.

Водопроводную воду для определения КТ засевают в объеме 333 мл (три объема по 100 мл, три — по 10 мл и три объема по 1 мл) во флаконы (колбы). При этом вода в объемах 100 и 10 мл засеивается во флаконы и пробирки с 10 и 1 мл концентрированной среды, а 1 мл — в пробирки с 10 мл среды нормальной концентрации.

Сточные воды для исследования засеивают в объемах: 1; 0,1; 0,01 и 0,001 в пробирки с 10 мл среды нормальной концентрации.

Посевы инкубируют в термостате 24 часа при 37°C.

При отсутствии БГКП образование кислоты и газа не происходит (помутнение может быть).

Рост БГКП сопровождается помутнением, образованием газа и изменением цвета среды (красный цвет переходит в желтый). Из подозрительных флаконов и пробирок на БГКП проводят посев на агар Эндо. Посевы инкубируют при 37°C в течение 24 часов. При отсутствии роста на агаре Эндо или при наличии колоний, не характерных для БГКП, дается отрицательный ответ.

Из колоний, характерных для бактерий БГКП (ярко-красные с металлическим оттенком), готовят мазки с окраской по Граму. Изучают культуру по оксидазному тесту — фильтровальную бумагу смачивают раствором нафтола-диэтил-фенилендиамин и на нее наносят штрихом снятые 2–3 колонии с агара Эндо.

Для кишечной палочки характерно: наличие грамтрицательных палочек в препарате (мазке) и отсутствие изменений в окраске индикаторной бумажки (отрицательная реакция на оксидазу).

Бактериологические показатели для питьевой (водопроводной воды, подвергнутой очистке и дезинфекции):

- общее микробное число — не более 100;
- коли-титр — не менее 300;
- коли-индекс не должен превышать 3.

Вода артезианских скважин должна соответствовать следующим нормам:

- общее микробное число — не более 100;
- коли-титр — не менее 500;
- коли-индекс — не более 2.

Вода открытых водоемов считается доброкачественной, если:

- общее микробное число — не более 1000;
- коли-титр — не менее 111;
- коли-индекс — не более 9.

Метод мембранных фильтров. Определение коли-индекса воды проводят методом концентрации бактерий из определенного ее количества на мембранных фильтрах с последующим их наложением

на плотные питательные среды. На поверхности фильтра вырастают колонии, которые поддаются количественному учету.

Мембранные фильтры изготавливают из нитроцеллюлозы с различными по размеру порами.

Для исследования воды используют фильтр № 3, который на своей поверхности задерживает БГКП.

Перед началом работы мембранные фильтры стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 10–15 мин.

Фильтр осторожно матовой поверхностью вверх накладывают на сетку фильтрационного прибора типа Зейтца, который предварительно должен быть простерилизован фламбированием.

В воронку наливают нужное количество воды и в приемной колбе создается вакуум при помощи водоструйного или другого насоса. Исследуемая вода просачивается через пластинку мембранного фильтра, а бактерии, находящиеся в ней, остаются на поверхности фильтра. По окончании фильтрации верхнюю часть прибора снимают, мембранный фильтр матовой стороной вверх переносят стерильным пинцетом на поверхность агара Эндо в чашках. Чашки крышками вниз помещают в термостат при 37°C на 18–24 ч.

Через поры мембранного фильтра происходит диффузия растворимых частей среды Эндо; вследствие этого на поверхности фильтра вырастают типичные колонии для БГКП — ярко-красные с металлическим оттенком.

По числу выросших колоний определяют количество кишечных палочек в 1 л воды и тем самым устанавливают коли-индекс.

Водопроводная вода исследуется в количестве 333 мл, т.е. она пропускается последовательно через четыре фильтра в объемах 3, 30, 100 и 200 мл.

Установление наличия в воде патогенных бактерий осуществляется путем посева на дифференциально-диагностические и селективные питательные среды с последующей их идентификацией методами, принятыми в микробиологии.

Контрольные вопросы

1. Правила взятия воды для санитарно-бактериологического исследований.

2. Как проводится определение общего микробного числа в воде?

3. Что такое коли-титр, коли-индекс воды, какова методика их определения?

4. В чем заключается основные приемы определения БГКП?

6.4. Методы количественного определения микробов в исследуемых объектах

Одним из способов определения общего микробного числа в исследуемых объектах является метод посева определенного объема или навески такого материала на плотные питательные среды. После культивирования посевов приступают к подсчету выросших колоний, по количеству которых судят о степени загрязненности исследуемых объектов.

Количественному учету подлежат все колонии, независимо от их величины, окраски, формы и т. п., принимая каждую колонию за одну бактериальную клетку.

В зависимости от количества выросших колоний при подсчете их поступают различно. Если их число при ориентировочной оценке не превышает 50, то прибегают к фронтальному (сплошному) подсчету. Для этого, повернув чашку вверх дном, при помощи лупы, считают все колонии, отмечая каждую сосчитанную колонию чернилами или восковым карандашом на дне чашки.

Для подсчета колоний при большом их количестве применяют метод выборочного подсчета, пользуясь специальными приемами:

1. Со стороны дна площадь чашки делят восковым карандашом на равное число секторов (на 4, или 6, или 8). Число колоний подсчитывают в одном из секторов. Полученное количество колоний умножают на число секторов. Таким образом вычисляют общее количество колоний, выросших на всей площади чашки.

2. Тем или иным приемом определяют среднее число колоний, которое выросло на площади 1 см^2 . Предварительно вычисляют площадь чашки по формуле $S = \pi R^2$. Стандартная чашка имеет радиус 5 см, следовательно, ее площадь равна $3,14 \times 25 = 78 \text{ см}^2$.

Среднее число колоний, выросших на площади 1 см^2 , умножают на площадь чашки. Полученное число выражает общее количество колоний, которое выросло на всей поверхности чашки.

3. Использование трафарета (шаблона).

Со стороны дна чашки накладывают трафарет, который имеет пять окон, площадь каждого из них составляет 1 см^2 . Подсчет колоний осуществляется в пяти окнах, после чего общее количество колоний делят на пять, получая среднее число колоний, выросших на площади в 1 см^2 .

4. Использование счетной камеры.

Она представляет собой стеклянную пластинку, укрепленную на деревянной подставке. Пластинка разделена на 144 квадрата, каждый из которых равен 1 см^2 ; квадраты, расположенные по диагонали, в свою очередь разделены на 9 малых квадратов каждый.

Для подсчета колоний чашку помещают под стеклянную пластинку вверх дном и подсчитывают число колоний в 10 квадратах (если колоний много, считают в малых квадратах). Определив среднее число колоний на 1 см² среды, умножают это число на площадь всей чашки и таким образом вычисляют число колоний на всей поверхности среды.

5. Использование аппарата для подсчета колоний.

Принцип подсчета в этом случае остается таким же, как и в счетной камере. Вместе с тем аппарат имеет дополнительные приспособления, позволяющие ускорить подсчет колоний. Для этого он имеет стационарную лупу, подсветку со сменными светофильтрами, авторучку с датчиком; одновременно с отметкой колоний количество их фиксируется на счетчике

При обработке данных по определению количества бактерий в исследуемых объектах принимают во внимание следующие положения;

1. Оценивают только те разведения, при посеве которых выросло на чашках от 30 до 300 колоний.
2. Полученные результаты округляют:

Таблица 3

При количестве бактерий	Результат округляют
от 1 до 100	полученное число
от 101 до 1000	до 10
от 1001 до 10000	до 1000
от 100001 до 1000000	до 10000

3. Для определения общего числа бактерий в исследуемых объектах (в почве, в кормах — в 1 г, в воде — в 1 мл) необходимо полученное число колоний умножить на степень разведения исследуемого материала. Например, при посеве 1 мл воды в разведении 1:10 на чашках выросло 120 колоний. Содержание бактерий в 1 мл воды составляет: $120 \times 10 = 1200$ бактерий.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алешина, Е.С. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие / Е.С. Алешина, Е.А. Дроздова, Н.А. Романенко; Оренбургский государственный университет. — Оренбург: Университет, 2017. — 192 с.: схем., табл., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=481743> (дата обращения: 26.01.2022). — Библиогр. в кн. — ISBN 978–5–7410–1658–9. — Текст: электронный.
2. Асонов Н.Р. Микробиология [Текст] / Н.Р. Асонов. — Москва: Колос, 2001. — 352 с.
3. Бакулина Н.А. Микробиология [Текст] / Н.А. Бакулина, Э.Л. Краева. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва: Медицина, 1980. — 448 с.
4. Белясова Н.А. Микробиология [Текст]: учебник / Н.А. Белясова. — Минск: Высшая школа, 2012. — 443 с.
6. Бовкун Г.Ф. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс]: учебно-метод. Пособие / Г.Ф. Бовкун. — Брянск: Брянский ГАУ, 2019. — 198 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133096> (дата обращения: 13.01.2022).
7. Ветеринарная микробиология и иммунология [Текст]: учебник / под ред. проф. В.Н. Кисленко. — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 752 с.
8. Ветеринарная микробиология и микология [Текст]: учебник / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. — Санкт-Петербург: Лань, 2014. — 624 с.
9. Вознесенский, Э.Ф. Методы структурных исследований материалов. Методы микроскопии: учебное пособие / Э.Ф. Вознесенский, Ф.С. Шарифуллин, И.Ш. Абдуллин; Министерство образования и науки России, Казанский национальный исследовательский технологический университет. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2014. — 184 с.: табл., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=428294> (дата обращения: 03.11.2021). — Библиогр. в кн. — ISBN 978–5–7882–1545–7. — Текст: электронный.

10. Выделение и идентификация бактерий: методические рекомендации для студентов биологического факультета специализации «Микробиология и вирусология» / Сост. О. И. Винникова, А. М. Самойлов, Ю. В. Попова — Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. — 60 с. — URL: http://plantphysiol-bio.univer.kharkov.ua/materials/Isolation%20and%20identification%20of%20bacteria_P1.pdf, (дата обращения: 08.02.2022).

11. Гусев, М. В. Микробиология [Текст] / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — Москва: Издательский центр «Академия», 2008. — 462 с.

12. Дегтярева, И. А. Биотехнологический потенциал почвенных микроорганизмов: учебно-методическое пособие: [16+] / И. А. Дегтярева, А. С. Сироткин; Казанский национальный исследовательский технологический университет. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2019. — 112 с.: ил., табл., схем. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=612203> (дата обращения: 29.01.2022). — Библиогр. в кн. — ISBN 978–5–7882–2647–7. — Текст: электронный.

13. Емцев, В. Т. Микробиология [Текст] / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — Москва: Дрофа, 2005. — 445 с.

14. Зарецкая Ю. М. Иммунология и иммуногенетика человека [Текст] / Ю. М. Зарецкая, Е. Г. Хамаганова, М. И. Губарев. — Москва: Триада-фарм, 2002. — 138 с.

15. Зюзина, О. В. Общая микробиология: лабораторный практикум: практикум / О. В. Зюзина; Тамбовский государственный технический университет. — Тамбов: Тамбовский государственный технический университет (ТГТУ), 2015. — 82 с.: ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=445121> (дата обращения: 31.01.2022). — Библиогр. в кн. — ISBN 978–5–8265–1431–3. — Текст: электронный.

16. Иванченко, О. Б. Биология и микробиология [Текст] / О. Б. Иванченко, Г. О. Ежкова, О. А. Решетник. — Казань, 2002. — 112 с.

17. Ивчатов, А. Л. Химия воды и микробиология [Текст]: учебник / А. Л. Ивчатов, В. И. Малов. — Москва: ИНФРА-М, 2006. — 218 с.

19. Иммунология [Текст]: в 3-х т. — Т. 2, 3; пер. с англ. / под ред. У. Пола. — Москва: Мир, 1987. — 1988. — 456 с.

21. Каменек, Д. В. Основы иммунологии [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Д. В. Каменек. — Москва; Берлин: Директ-Медиа, 2021. — 273 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=602212> (дата обращения: 01.09.2021).

22. Каменская, Е. П. Изучение морфологии и цитологии микроорганизмов: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по курсам «Основы микробиологии», «Микробиология», «Об-

щая биология и микробиология» для студентов направлений подготовки 240700.62, 260100.62, 100800.62 всех форм обучения / Е. П. Каменская; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. — Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. — 48 с. — URL: <https://docplayer.com/28520251-E-p-kamenskaya-izuchenie-morfologii-i-citologii-mikroorganizmov.html> (дата обращения: 09.02.2022).

23. Камышева, К. С. Основы микробиологии и иммунологии [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / К. С. Камышева. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2020. — 383 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=601646> (дата обращения: 01.09.2021).

24. Карпенков, С. Х. Экология [Электронный ресурс]: учебник для вузов; в двух книгах. — Книга 1 / С. Х. Карпенков. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва; Берлин: Директ-Медиа, 2017. — 432 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=454236> (дата обращения: 25.07.2021).

25. Карпова, А. Ю. Общая и почвенная микробиология [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / А. Ю. Карпова. — Ижевск: Ижевская ГСХА, 2020. — 80 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/158587> (дата обращения: 13.01.2022).

26. Кисленко, В. Н. Микробиология [Текст]: учебник / В. Н. Кисленко, М. Ш. Азаев. — Москва: ИНФРА-М, 2015. — 272 с.

27. Колоколова, Н. Н. Микробиология: учебно-методические указания для студентов подготовки направления 06.03.01 Биология (уровень бакалавриата) и специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика, форма обучения очная: [16+] / Н. Н. Колоколова, Л. Ф. Косолапова; отв. ред. Н. А. Боме; Тюменский государственный университет. — Тюмень: Тюменский государственный университет, 2018. — 72 с.: ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=572872> (дата обращения: 03.08.2021). — Библиогр. в кн. — Текст: электронный.

28. Кочемасова, З. Н. Санитарная микробиология и вирусология [Текст] / З. Н. Кочемасова, С. А. Ефремова, А. М. Рыбакова. — Москва: Медицина, 1987. — 352 с.

29. Кротова, Л. А. Микробиология: практикум: учебное пособие / Л. А. Кротова, С. П. Чибис. — Омск: Омский ГАУ, 2021. — 99 с. — ISBN 978-5-89764-987-7. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/197775> (дата обращения: 31.01.2022). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

30. Ксенофонтов, Б. С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии [Текст]: учеб. пособие / Б. С. Ксенофонтов. — Москва: ИНФРА-М, 2015. — 224 с.

31. Кузнецова, Е. А. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие; в двух частях: Ч. 1 / Е. А. Кузнецова, А. А. Князев. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2017. — 88 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=560675> (дата обращения: 17.07.2021).

32. Кузнецова, Е. А. Микробиология: учебное пособие: в 2 частях: [16+] / Е. А. Кузнецова, А. А. Князев; Казанский национальный исследовательский технологический институт. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2019. — Часть 2. — 80 с.: ил., табл., схем. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=683778> (дата обращения: 18.02.2022). — Библиогр. в кн. — ISBN 978-5-7882-2279-0 (Ч. 2). — ISBN 978-5-7882-2277-6 (общ.). — Текст: электронный.

33. Кузнецова, Е. А. Микробиология: учебное пособие: в 2 частях / Е. А. Кузнецова, А. А. Князев; Министерство образования и науки России, Казанский национальный исследовательский технологический университет. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2017. — Ч. 1. — 88 с.: табл., граф., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=560675> (дата обращения: 29.01.2022). — Библиогр.: с. 62–82. — ISBN 978-5-7882-2277-6. — ISBN 978-5-7882-2278-3 (ч. 1). — Текст: электронный.

34. Куранова, Н. Г. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие: Ч. 2. Метаболизм прокариот / Н. Г. Куранова. — Москва: Прометей, 2017. — 100 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=483200> (дата обращения: 19.07.2021).

35. Куранова, Н. Г. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие. — Ч. 3. Мир прокариот / Н. Г. Куранова, Г. А. Купатадзе. — Москва: Прометей, 2020. — 119 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=612078> (дата обращения: 17.07.2021).

36. Левинсон, У. Медицинская микробиология и иммунология [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / У. Левинсон; пер. с англ. В. Б. Белобородова. — 2-е изд. — Москва: Лаборатория знаний, 2020. — 1184 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/135501> (дата обращения: 13.01.2022).

37. Лелевич, С. В. Клиническая микробиология [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / С. В. Лелевич, О. М. Волчкевич, Е. А. Сидорович. — 2-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 308 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/143694> (дата обращения: 13.01.2022).

38. Лунгу, И. Н. Практикум для студентов по дисциплине «Основы микробиологии, физиологии питания, санитарии и гигиены»:

[12+] / И. Н. Лунгу, Н. В. Пушина, Ж. В. Морозова. — Москва; Берлин: Директ-Медиа, 2021. — 98 с.: табл., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=598782> (дата обращения: 29.01.2022). — Библиогр. в кн. — ISBN 978–5–4499–1640–2. — DOI 10.23681/598782. — Текст: электронный.

39. Маннапова, Р. Т. Микробиология и иммунология [Текст]: учеб. пособие / Р. Т. Маннапова. — Москва: Изд-во РГАУ-МСХА, 2015. — 77 с.

40. Маннапова, Р. Т. Микробиология и микология [Электронный ресурс]: особо опасные инфекционные болезни, микозы и микотоксикозы / Р. Т. Маннапова. — Москва: Проспект, 2018. — 381 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=494382> (дата обращения: 13.09.2021).

41. Маракулин, И. В. Медицинская микробиология. Курс лекций [Текст]: учеб. пособие / И. В. Маракулин. — Киров: ФГБОУВПО «ВятГУ», 2011. — 119 с.

42. Методы исследования в биологии и медицине: учебник / В. Каныков, А. Стадников, О. Трубина, А. Стрекаловская; Оренбургский государственный университет, Оренбургская государственная медицинская академия, Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С. Н. Федорова», Оренбургский филиал. — Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2013. — 192 с. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=259268> (дата обращения: 03.11.2021). — Библиогр. в кн. — Текст: электронный.

43. Микробиологический практикум: учебное пособие / К. Л. Шнайдер, М. Н. Астраханцева, З. А. Канарская и др.; Федеральное агентство по образованию, Казанский государственный технологический университет. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2010. — 83 с.: ил., табл., схем. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=259055> (дата обращения: 03.11.2021). — Текст: электронный.

44. Микробиология, вирусология, иммунология: практикум для стоматологического факультета / Т. А. Канашкова БГМУ, 2019–104 с. — Режим доступа: URL: <http://rep.bsmu.by/bitstream/handle/BSMU/25669/978-985-21-0328-2.Image.Marked.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (дата обращения: 03.11.2022). — Текст: электронный.

45. Микробиология [Текст]: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. — 107 с.

46. Микробиология: практикум / И. С. Татьяначенко, А. С. Казакова, Л. А. Кулешова, С. Ю. Майборода, С. В. Посохова; под ред. И. С. Та-

тьянченко. — Зерноград: АЧИИ ФГБОУ ВО ДГАУ, 2018. — 92 с. — URL: <http://ачии.рф/files/2018-10-15-8b756faa-4f9e-4375-b81c-8a5e037c6c3d.pdf> (дата обращения: 04.12.2021).

47. Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика): учебное пособие / Г. П. Шуваева, Т. В. Свиридова, О. С. Корнеева [и др.]; науч. ред. В. Н. Калаев; Воронежский государственный университет инженерных технологий. — Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2017. — 317 с.: табл., граф., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=482028> (дата обращения: 08.02.2022). — Библиогр.: с. 311–312. — ISBN 978-5-00032-239-0. — Текст: электронный.

48. Микробиология. Университетский курс [Текст]: учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Академия, 2012. — 383 с.

49. Микробиология [Текст]: учебник / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — 8-е изд., испр. и доп. — Москва: Юрайт, 2014. — 445 с.

50. Микробиология [Текст]: учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — Москва: Академия, 2012. — 379 с.

51. Микробиология [Текст]: учебник / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — Москва: Академия, 2006. — 349 с.

52. Микробиология [Текст]: учеб. пособие / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, А. Х. Волков [и др.]. — 2-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2017. — 496 с.

53. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие для вузов / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, А. Х. Волков [и др.] — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2021. — 496 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/171851> (дата обращения: 13.01.2022).

54. Микробиология: учебное пособие / составитель Е. В. Скрипникова. — Тамбов: ТГУ им. Г. Р. Державина, 2019. — 156 с. — ISBN 978-5-00078-313-9. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/156859> (дата обращения: 31.01.2022). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

55. Микробиология: учебное пособие / составитель О. М. Соболева. — Кемерово: Кузбасская ГСХА, 2018. — 111 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/143026> (дата обращения: 15.02.2022). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

56. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие / А. К. Галиуллин, Ф. М. Нургалиев, П. В. Софронов [и др.]. — Казань: КГБВМ им. Баумана, 2019. — 54 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/129432> (дата обращения: 13.01.2022).

57. Микробиология [Текст]: учебник / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. — 6-е изд., исправ. — Москва: Дрофа, 2006. — 445 с.

58. Микробиология [Текст]: учебник / О. Д. Сидоренко [и др.]. — Москва: ИНФРА-М, 2005. — 287 с.

60. Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика): учебное пособие: [16+] / Г. П. Шуваева, Т. В. Свиридова, О. С. Корнеева [и др.]; науч. ред. В. Н. Калаев; Воронежский государственный университет инженерных технологий. — Воронеж: Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2017. — 317 с.: табл., граф., ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=482028> (дата обращения: 26.01.2022). — Библиогр.: с. 311–312. — ISBN 978–5–00032–239–0. — Текст: электронный.

61. Мурадова, Е. О. Микробиология: полный курс к экзамену: [16+] / Е. О. Мурадова; Научная книга. — 2-е изд. — Саратов: Научная книга, 2020. — 335 с. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=578516> (дата обращения: 27.01.2022). — ISBN 978–5–9758–1924–6. — Текст: электронный.

62. Общая санитарная микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие. — Ч. 1 / сост. Л. А. Литвина. — Новосибирск: НГАУ, 2014. — 111 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=278167> (дата обращения: 19.12.2021).

63. Основы учения об инфекции и противомикробном иммунитете [Текст] / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, А. А. Новицкий. — 2-е изд., испр. — Санкт-Петербург: Лань, 2017. — 560 с.

64. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Текст]: учеб. Пособие / С. А. Павлович. — Минск: Высшая школа, 2013. — 799 с.

66. Пак, И. В. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / И. В. Пак, О. В. Трофимов, О. А. Величко. — Тюмень: Тюменский государственный университет, 2018. — 160 с. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=567615> (дата обращения: 27.07.2021).

67. Плешакова, В. И. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / В. И. Плешакова, Н. А. Лещева, Т. И. Лоренгель. — Омск: Омский ГАУ, 2019. — 75 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/126624> (дата обращения: 13.01.2022).

68. Покровский, В. И. Медицинская микробиология [Текст] / В. И. Покровский, О. К. Поздеев. — Москва: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. — 1200 с.

69. Сахарова, О. В. Водная микробиология [Электронный ресурс]: учебник для вузов / О. В. Сахарова, Т. Г. Сахарова. — Санкт-Петербург:

Лань, 2021. — 260 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/183169> (дата обращения: 13.01.2022).

70. Сахарова, О. В. Общая микробиология и общая санитарная микробиология [Электронный ресурс]: учеб. Пособие / О. В. Сахарова, Т. Г. Сахарова. — 2-е изд., испр. — Санкт-Петербург: Лань, 2019. — 224 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/123667> (дата обращения: 13.01.2022).

71. Техника приготовления и окраски микропрепарата: Методические указания: методические указания / составитель Е. Н. Закрепина. — Вологда: ВГМХА им. Н. В. Верещагина, 2020. — 15 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/159445> (дата обращения: 30.01.2022). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

72. Труфанов, А. М. Микробиология: учебно-методическое пособие / А. М. Труфанов. — Ярославль: Ярославская ГСХА, 2017. — 82 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/131308> (дата обращения: 07.02.2022). — Режим доступа: для авториз. пользователей.

73. Фролов, С. В. Приборы, системы и комплексы медико-биологического назначения: учебное пособие: в 10 частях / С. В. Фролов, Т. А. Фролова; Тамбовский государственный технический университет. — Тамбов: Тамбовский государственный технический университет (ТГТУ), 2015. — Часть 3. Лабораторное оборудование для биологии и медицины. — 82 с.: ил., табл., схем. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=444716> (дата обращения: 05.11.2021). — Библиогр. в кн. — ISBN 978-5-8265-1333-0. — ISBN 978-5-8265-1427-6 (ч. 3). — Текст: электронный.

74. Хабибрахманова, В. Р. Техника проведения лабораторных исследований: учебное пособие: [16+] / В. Р. Хабибрахманова, С. А. Коваленко, М. А. Сысоева; Министерство образования и науки России, Казанский национальный исследовательский технологический университет. — Казань: Казанский научно-исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2017. — 152 с.: ил. — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=500913> (дата обращения: 07.11.2021). — Библиогр.: с. 140-141. — ISBN 978-5-7882-2263-9. — Текст: электронный.

75. Хаитов, Р. М. Иммунология [Текст] / Р. М. Хаитов, Г. Л. Игнатьева, И. Г. Сидорович. — Москва: Медицина, 2000. — 432 с.

76. Черкес, Ф. К. Бोगоявленская Л. Б., Бельская Н. А. Микробиология [Текст] / Ф. К. Черкес, Л. Б. Бोगоявленская, Н. А. Бельская. — Москва: Медицина, 1986. — 558 с.

77. Шапиро, Я. С. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Я. С. Шапиро. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 308 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/126153> (дата обращения: 13.01.2022).

78. Шлегель, Г. Г. Общая микробиология (Allgemeine Mikrobiologie): пер. с нем. [Электронный ресурс] / Ганс Гюнтер Шлегель. — Москва: Мир, 1987. — 566 с. — URL: <https://microbius.ru/documents/387/download> (дата обращения: 12.09.2021).

79. Шлопов, В. Г. Прионовые инфекции [Текст] / В. Г. Шлопов // Вестник ветеринарии. — 2003. — № 2 (26). — С. 65–75.

80. Эпизоотология с микробиологией [Электронный ресурс]: учебник для вузов / А. С. Алиев, Ю. Ю. Данко, И. Д. Ещенко [и др.]; под ред. В. А. Кузьмина, А. В. Святковского. — 6-е стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2021. — 432 с. — URL: <https://e.lanbook.com/book/162384> (дата обращения: 13.01.2022).



Примерные тестовые задания

Первый вариант

1. С помощью световых микроскопов в лаборатории можно изучать (выберите несколько правильных ответов):

- а) особенности строения и морфологии клеток;
- б) первичное определение изучаемых организмов;
- в) особенности роста и развития различных микроорганизмов;
- г) строение органоидов;
- д) строение макромолекул.

2. К механической части микроскопа относятся (выберите несколько правильных ответов):

- а) штатив;
- б) предметный столик;
- в) тубус;
- г) винты;
- д) окуляр.

3. Произведение увеличения объектива на увеличение окуляра называется:

- а) общее увеличение;
- б) четкость;
- в) изображение;
- г) разрешающая способность.

4. Каким образом следует переносить микроскопа с одного рабочего места на другое (выберите несколько правильных ответов):

- а) двумя руками;
- б) запрещено наклонять;
- в) можно переносить в любом положении;
- г) одной рукой;
- д) только в упаковке.

5. Прибор, предназначенный для получения дистиллированной воды это:

- а) дистиллятор;
- б) рекультиватор;
- в) озонатор;
- г) аспиратор.

6. В состав центрифуги входят следующие компоненты (выберите несколько правильных ответов):

- а) ротор;
- б) привод;
- в) корпус;
- г) рабочая камера;
- д) ТЭН.

7. Для сушильного шкафа характерно (выберите несколько правильных ответов):

- а) колебания температуры нагрева в диапазоне от 200 до 350°C;
- б) использования для определения количества влаги или других жидкостей в веществе;
- в) использование для стерилизации или вакуумной сушки;
- г) колебания температуры нагрева в диапазоне от 60 до 100°C;
- д) колебания температуры нагрева в диапазоне от 900 до 1300 °C.

8. Для колбонагревателя характерно (выберите несколько правильных ответов):

- а) наличие термодатчиков, которые контролируют температуру;
- б) использование в качестве прибора для нагрева одной или нескольких круглодонных колб;
- в) дополнение при необходимости магнитной мешалкой;
- г) использование в качестве прибора для нагревания сред;
- д) колебания температуры нагрева в диапазоне от 900 до 1300 °C.

9. Для выпаривания или нагревания жидкости используются:

- а) пробирки;
- б) колбы;
- в) стаканы;
- г) фарфоровые чашки.

10. Для измельчения твердых веществ используются:

- а) фарфоровые ступки;
- б) колбы;
- в) стаканы;
- г) фарфоровые чашки.

11. Один из самых часто используемых способов стерилизации — это:

- а) кипячение;
- б) облучение;
- в) автоклавирование;
- г) пастеризация.

12. При соблюдении особых условий такие препараты могут храниться без потери своих свойств в течение многих лет:

- а) витальные;
- б) убитые;
- в) постоянные;
- г) временные.

13. Для приготовления препарата на предметное стекло с агаризованной питательной средой вносят исследуемую культуру. Это имеет место в случае:

- а) препарата «раздавленная капля»;
- б) препарата «висячая капля»;
- в) препарата «отпечаток»;
- г) препарата «микрокультура».

14. Этап приготовления препарата, который предполагает проведение препарата с мазком через самую горячую часть пламени спиртовки называется:

- а) получение мазка;
- б) высушивание;
- в) фиксация;
- г) окрашивание.

15. К основным условиям культивирования микроорганизмов относятся (выберите несколько правильных ответов):

- а) температурный режим;
- б) влажность;
- в) сроки культивирования;
- г) аэрация;
- д) фильтрация.

16. Биохимическая реакция брожения, осуществляемая микроорганизмами, в результате которой углеводороды (преимущественно глюкоза) преобразуется в молекулы этанола и углекислого газа, называется:

- а) молочнокислое брожение;
- б) спиртовое брожение;
- в) уксуснокислое брожение;
- г) пропионовокислое брожение.

17. Эти бактерии составляют последнее звено анаэробной пищевой цепи, в начале которой находятся углеводы, белки, липиды. Они образуют метан:

- а) отдел *Firmicutes*;
- б) отдел *Gracilicutes*;
- в) отдел *Mendosicutes*;
- г) рода *Propionibacterium*.

18. Допишите: для получения накопительной культуры целлюлозоразрушающих аэробных бактерий используют среду...

19. Низовые дрожжи называют так потому, что при брожении они вызывают:

- а) образование различных побочных продуктов;
- б) бурный процесс;
- в) выделение углекислого газа;
- г) выделение пены.

20. Кто впервые доказал причину брожения и гниения:

- а) А. ван Левенгук;
- б) Л. Пастер;
- в) Р. Кох;
- г) Эдгар Ру.

21. Назначение питательных сред в микробиологической практике это:

- а) культивирование микроорганизмов;
- б) определение иммунограммы;
- в) изучение биохимических свойств микроорганизмов;
- г) сохранение музейных и производственных культур микроорганизмов.

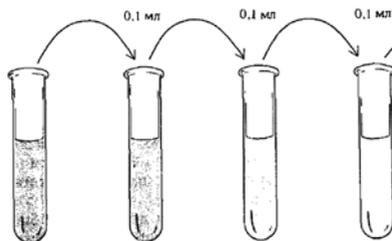
22. Основоположник почвенной микробиологии это:

- а) Л. Пастер;
- б) Р. Кох;
- в) С. Виноградский;
- г) Н. Гамалея.

23. Окраска для обнаружения волютина, ДНК клеток бактерий, осуществляется по:

- а) Романовскому — Гимзе;
- б) Циль — Нильсону;
- в) Нейссеру;
- г) Грамму.

24. Как называется метод, изображенный на рисунке? Назовите его.



25. Дайте определение: минимальный объем воды в миллилитрах, в котором обнаруживается одна бактерия кишечной палочки — это?

26. Какой процесс изображен на рисунке? С помощью какого инструмента?



27. Метод дифференциальной окраски, основанный на наличии и особенностях состава клеточной стенки, разработан:

- а) Л. Пастер;
- б) Р. Кохом;
- в) Х. Грамом;
- г) И. И. Мечниковым.

Второй вариант

1. В оптическую часть светового микроскопа входят (выберите несколько правильных ответов):

- а) штатив;
- б) револьвер;
- в) макровинт;
- г) объектив;
- д) окуляр.

2. Разрешающая способность микроскопа и качество изображения светового микроскопа зависят от:

- а) объектива;
- б) микровинта;
- в) зеркала;
- г) тубуса.

3. В зависимости от расположения источника света световые микроскопы бывают (выберите несколько правильных ответов):

- а) прямые;
- б) инвертированные;
- в) видимого света;
- г) ультрафиолетовые;
- д) флуорисцентные.

4. В зависимости от источника света световые микроскопы бывают (выберите несколько правильных ответов):

- а) ультрафиолетовые;
- б) видимого света;
- в) флуорисцентные;
- г) электронные;
- д) поляризационные.

5. Прибор для разделения смеси неоднородного состава на составные части по различной плотности с использованием центробежной силы это:

- а) центрифуга;
- б) весы;
- в) гомогенизатор;
- г) автоклав.

6. Дистиллятор имеет следующие составные части (выберите несколько правильных ответов):

- а) камера испарения с сепараторами;
- б) конденсатор;
- в) ТЭН;
- г) уравнители;
- д) ротор.

7. Черты, характерные для муфельной печи (выберите несколько правильных ответов):

- а) температура нагрева до 200 °С;
- б) наличие особых вытяжных устройств;
- в) применение для стерилизации или вакуумной сушки;
- г) колебания температуры нагрева в диапазоне от 60 до 100°С;
- д) колебания температуры нагрева в диапазоне от 900 до 1300 °С.

8. Для песчаной бани характерно (выберите несколько правильных ответов):

- а) колебания температуры нагрева в диапазоне от 300 до 400 °С;
- б) нагревательное устройство, где теплоносителем является песок;
- в) использование для пробоподготовки и для анализа образцов;
- г) использование как прибора для нагревания сред;
- д) колебания температуры нагрева в диапазоне от 900 до 1300 °С.

9. Для культивирования некоторых микроорганизмов, которым необходимы анаэробные или микроаэрофильные условия, используют:

- а) анаэроустат;
- б) аспиратор;
- в) рН-метр;
- г) холодильник.

10. Для эффективного и быстрого подсчета числа колоний микроорганизмов, выросших на чашках Петри, используют:

- а) анаэроустат;
- б) аспиратор;
- в) рН-метр;
- г) счетчик колоний.

11. Способ, который обеспечивает уничтожение в материале всех вегетативных и споровых форм как патогенных, так и непатогенных микроорганизмов:

- а) изучение;
- б) стерилизация;

- в) иммунизация;
- г) иммунопрофилактика.

12. Мазки фиксируют (выберите несколько правильных ответов):

- а) для умерщвления микроорганизмов;
- б) для прочного прикрепления клеток микроорганизмов к покровному стеклу;
- в) для лучшего окрашивания микроорганизмов;
- г) для наблюдения за подвижностью микроорганизмов;
- д) для изучения процесса деления микробов;
- е) для наблюдения за процессом образования колоний.

13. К основным красителям относятся (выберите несколько правильных ответов):

- а) метиленовый синий;
- б) основной фуксин;
- в) генициановый фиолетовый;
- г) кристаллвиолет;
- д) эозин;
- е) нигрозин.

14. Для фиксации мазка химическим способом используют (выберите несколько правильных ответов):

- а) этанол;
- б) метанол;
- в) кислый фуксин;
- г) смесь равных частей этанола и эфира;
- д) сафранин;
- е) нигрозин.

15. Исследуемые объекты (микробы) в данном препарате находятся в своих естественных условиях. Что это за препарат:

- а) препарат «раздавленная капля»;
- б) препарат «висячая капля»;
- в) препарат «отпечаток»;
- г) препарат «микрокультура».

16. Побочный продукт спиртового брожения это:

- а) глицерин;
- б) муравьиная кислота;
- в) серная кислота;
- г) температура 25°C.

17. Возбудителями анаэробного брожения клетчатки являются бактерии:

- а) Clostridium felsineura;
- б) Bac. Omeljanskii;
- в) Sarcina ventriculi;
- г) Cladosporium.

18. Допишите фразу: если молочная кислота составляет не менее 90% всех продуктов и сопровождается выделением дополнительно этилового спирта, уксусной кислоты, углекислого газа, то брожение является...

19. Практическое использование продуктов маслянокислого брожения имеет место:

- а) при квашении овощей;
- б) при созревании слабой соленой рыбы;
- в) при изготовлении сыров;
- г) при изготовлении безалкогольной продукции.

20. Полное уничтожение в объекте всех микроорганизмов — это:

- а) автоклавирование;
- б) обработка паром;
- в) дезинфекция;
- г) стерилизация.

21. Среды, применяемые для выделения определенных видов микроорганизмов, называются:

- а) дифференциально-диагностическими;
- б) селективными;
- в) плотными;
- г) общедоступными.

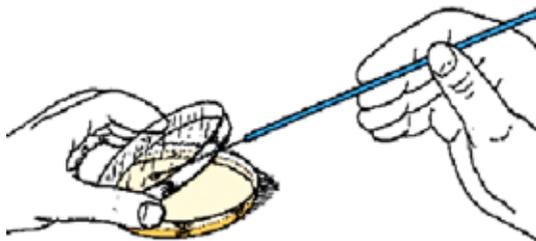
22. Кто разработал и ввёл в микробиологическую практику бактериологический метод?

- а) Л. Пастер;
- б) Р. Кох;
- в) Х. Грам;
- г) И. И. Мечников.

23. При окраске по Граму грамположительные бактерии окрашиваются...

- а) розовым цветом;
- б) сириневым цветом;
- в) черным цветом;
- г) фиолетовым цветом.

24. Как называется метод, изображенный на рисунке, назовите? Каким инструментом?



25. Дайте определение процессу, который характеризуется расщеплением (окислением) сложных органических веществ до более простых продуктов с освобождением заключенных в них энергии. Эта энергия используется микроорганизмами для синтеза веществ данной клетки.

26. Какой метод приготовления препарата изображен на рисунке?



27. Назовите ученого, который предложил использовать окраску спор бактерий для выявления кислотоустойчивых:

- а) Романовский — Гимза;
- б) Циль — Нильсон;
- в) Нейссер;
- г) Грамм.

КЛЮЧ К ТЕСТУ

Номер вопроса	Вариант 1	Вариант 2
1	1-абв	1-вгд
2	абвг	аб
3	а	а
4	аб	абв
5	а	а
6	абвг	абвг
7	абв	бд
8	абв	абв
9	г	а
10	а	г
11	в	б
12	в	абв
13	г	абвг
14	в	абвг
15	абвг	б
16	б	а
17	в	б
18	Имшенецкий	Гетероферментативный
19	а	г
20	б	г
21	а	б
22	в	б
23	а	г
24	Метод последовательных разведений	Посев. Микробиологическая петля
25	Колли-титр	Катаболизм
26	Посев. Шпатель Дригальского	Висячая капля
27	в	б

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

*Монтина Ирина Михайловна
Минина Наталья Николаевна*

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Учебное пособие

Электронное издание комплексного распространения

Отв. редактор — Ж. С. Тихонова. Корректор — П. В. Багров.
Верстка издания и дизайн обложки — © Д. В. Нефедов

Сдано в набор 21.11.2024 г. Гарнитура HeliosCondC. Усл. печ. л. 9,94.

ISBN 978-5-6053359-0-0



9 785605 335900 >