

*НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ*

*АГРОНОМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ*

# **МИКРОБИОЛОГИЯ**

*УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ*

*Новосибирск 2016*

# **МИКРОБИОЛОГИЯ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

*Новосибирск 2016*

Кафедра агроэкологии и микробиологии

УДК 576.8 ББК28.4

Составитель д. б. н., проф. Н.Н. Наплекова

Рецензент д.с/х. н., проф. Р.А. Цильке

Микробиология: Методические указания к лабораторно-практическим занятиям / Новосиб. гос. аграр. ун-т; сост. Н.Н. Наплекова - Новосибирск, 2016.- 48с.

Рассматриваются правила работы в лаборатории, строение и функции микроорганизмов разных таксономических групп, влияние на них условий окружающей среды.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Настоящие методические указания подготовлены в соответствии с программой курса «Микробиология», утвержденной Госстандартом Высшего образования.

В целях более углубленного усвоения материала и для облегчения работы студентов в пособии вначале излагаются контрольные вопросы, а затем даются методические указания по практическому выполнению работы, а также краткие указания организационного порядка.

На каждом занятии дается раздел самостоятельной работы и задание на дом. Такое расположение материала будет способствовать выработке у студентов способности к самостоятельному осмыслению связи между теоретическими и фактическими результатами, полученными в ходе выполнения лабораторной работы. Все предлагаемые опыты составлены исходя из возможности их выполнения и учета не более чем на двух последовательно идущих лабораторных занятиях.

Методически выполнение опытов рассчитано на использование общепринятых приемов работы в микробиологии, не требующих сложного оборудования. Для определения микроорганизмов рекомендуются классификации микроорганизмов Берджи(1957) и Н.А. Красильникова (1949).

При составлении программы занятий учтены достижения микробиологии последних лет и с современных позиций изложены сведения о структуре и функции бактериальной клетки, об экологии микроорганизмов и влиянии разных биологических, физических и химических факторов на рост и функционирование микробной клетки.

Особое внимание в лабораторных занятиях уделено разделам общей микробиологии, методам микробиологических исследований, морфологии различных таксономических групп микроорганизмов, технике их глубинного и поверхностного выращивания. Такое последовательное ознакомление студентов с разными разделами микробиологии позволит им использовать приобретенные навыки и теоретические знания не только при освоении общей программы по микробиологии, но и при выполнении научно-исследовательской работы.

# **ЗАНЯТИЕ 1**

## **Тема 1. Микробиологическая лаборатория**

### **Оснащение занятия**

Микроскоп, матерчатые и марлевые салфетки, готовые мазки - препараты различных форм микроорганизмов (бактерии, бациллы, кокки, извитые формы, актиномицеты, дрожжи, грибы), набор красителей, спирт, физраствор, спиртовка, бактериологическая петля, флакон с кедровым маслом, дистиллированная вода, пипетка, песочные часы, фарфоровая ванночка со стеклами, фильтровальная бумага, культуры кишечной палочки, сенной палочки и дрожжей в пробирках.

Каждая подгруппа (15 человек) должна иметь таблицы по формам клеток микроорганизмов и ходу лучей в световом микроскопе.

### **Контрольные вопросы**

1. Правила работы и техника безопасности в микробиологической лаборатории.
2. Типы микробиологических лабораторий.
3. Оборудование лаборатории.
4. Оборудование рабочего стола.

### ***Правила работы в микробиологической лаборатории***

Вы приступаете к работе в лаборатории, где изучают очень мелкие живые организмы – микроорганизмы. Размеры их определяются микрометрами, т.е. тысячными долями миллиметра. Отсюда и название лаборатории: микробиологическая. По своему назначению эти лаборатории могут быть клинико-диагностическими, где изучают возбудителей болезней человека и животных, проверяются наиболее эффективные вакцины и сыворотки для профилактики инфекционных заболеваний; санитарно-эпидемиологические, ответственные за разработку и проведение санитарно-профилактических и противоэпидемических мероприятий; контрольные (на станциях защиты растений, мясокомбинатах, консервных, молочных, хлебных, пивоваренных, дрожжевых заводах, заводах по приготовлению бактериальных препаратов), научные и учебные.

В состав лаборатории входят комнаты для микробиологических исследований и подсобные помещения: боксовая комната, автоклавная – для стерилизации посуды и сред, моечная, комната для приготовления, розлива сред и их хранения, виварий для подопытных животных, комната для хранения реактивов и инвентаря.

Под микробиологическую лабораторию отводят наиболее светлые и просторные помещения. Освещение ее должно быть не менее 110 лк. Стены в мик-

робиологической лаборатории на высоту 170 см от пола окрашиваются в светлые тона. Пол и поверхность столов закрывают линолеумом. Все это делается для того, чтобы при уборке помещения пользоваться дезрастворами. В каждой комнате должны быть раковина с подводкой водопроводной воды и сосуды с дезрастворами.

У нас для проведения микробиологических исследований отведена одна учебная лаборатория и автоклавная.

Студенты агрономического факультета в лаборатории будут знакомиться с микроорганизмами почвы, воды, воздуха, поверхности растений и корневой зоны, т.е. с непатогенными микроорганизмами. Однако при посеве различного материала на питательные среды (особенно почвы), которая является резервуаром любых микроорганизмов, могут быть выделены и патогенные формы, так как многие из них длительное время сохраняются в объектах окружающей среды.

Ниже приводятся правила работы в микробиологической учебной лаборатории, которые являются общими для всех бактериологических лабораторий:

1. Не входить в лабораторию в пальто, не вносить посторонних предметов.
2. Работать в лаборатории в наглухо застегнутом халате и головном уборе (косынка, шапочка, колпачок) и только на одном постоянном закреплённом за студентом месте с микроскопом и материалами.
3. На рабочем месте не должно быть ничего лишнего, кроме оборудования, которое на нем установлено, и всего необходимого для выполнения задания.
4. Соблюдать чистоту и опрятность в работе, работать сидя. Не допускать излишних разговоров и хождений. Соблюдать правила обращения со спиртовкой, электроприборами, химическими реактивами.
5. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и т.п. поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором (1%-й раствор хлорамина, 3%-й раствор фенола). Пинцеты, иглы, бактериологические петли и другие металлические предметы обжечь в пламени спиртовки и поставить на место.
6. Чашки Петри и пробирки с питательной средой, засеянной культурами микроорганизмов, поставить в термостат, написать на них восковым карандашом фамилию студента, номер группы и дату посева.
7. Стол, одежду, обувь и другие предметы при случайном попадании культуры микроорганизмов (разбилась пробирка, чашка, упала петля, капля с культурой) подвергнуть немедленной дезинфекции в присутствии преподавателя 3%-м раствором фенола с помощью ваты и пинцета. Вату после обработки опустить в сосуд с дезраствором, который находится на лабораторном столе, пинцет прокалить над пламенем спиртовки.
8. После окончания работы бактериальные культуры и остатки исследуемого материала сдать преподавателю. Выносить из лаборатории мазки с культурами или культуры в пробирках, чашках, категорически запре-

щается. Навести порядок на рабочем столе, микроскоп закрыть чехлом, показать преподавателю тетрадь с записями и зарисовками. Убрать халат и шапочку в полиэтиленовый мешок.

9. Сдать стол дежурному студенту, тщательно вымыть руки с мылом. Дежурный студент сдает аудиторию дежурному лаборанту.
10. Все студенты, ознакомившись с правилами работы и техники безопасности в микробиологической лаборатории, расписываются в специальном журнале по технике безопасности.
11. Категорически запрещается принимать пищу, хранить продукты питания, курить. Рекомендуются меньше разговаривать и без необходимости двигаться.
12. Помещение лаборатории убирать влажным способом ежедневно до начала занятий, стирать пыль со столов и мыть пол. По окончании занятий помещение обработать бактерицидной лампой в течение часа.
13. Пересев культур микроорганизмов производить в боксе, который должен быть чисто вымыт горячей водой с мылом и облучен бактерицидной лампой.
14. Рабочие халаты кипятить, затем стирать и гладить в помещении лабораторий.
15. Уходя, выключить все электроприборы, кроме термостата и холодильников.

### ***Оборудование микробиологической лаборатории***

Оборудование в учебной лаборатории такое же, как и в любой микробиологической лаборатории:

1. Микроскоп – для изучения формы и структуры клеток микроорганизмов.
2. Термостат – прибор с двойными стенками, между которыми находится воздух или вода. С помощью терморегулятора в термостате поддерживается постоянная температура. Контролируют температуру термометром, установленным в верхней стенке термостата. Мезофилы выращиваются в термостате при температурах от 25° С (для большинства почвенных микроорганизмов) до 37°С (для патогенных микроорганизмов, микроорганизмов кожных покровов, кишечника человека и животных). Термофилы выращиваются на жидких средах при температурах от 45°С до 60°С. Облигатные психрофилы выращиваются при температурах от 5° С до 10°С в специальных холодильных камерах. Факультативные психрофилы развиваются при температурах, благоприятных для мезофилов, и выращиваются в термостатах.
3. Автоклав – прибор для стерилизации питательных сред и посуды, используемой в лаборатории. Это самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации. В автоклаве стерилизуемые материалы нагревают чистым насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного на 0,2 – 2 атм. Обычно стерилизация в автоклаве

проводится при 1 атм (сверх нормального атмосферного), что соответствует 120,6°C. И только стерилизацию почвы или сильно заспоренного материала проводят при повышенном до 2 атм давлении, что соответствует 134°C. Питательные среды, содержащие углеводы, стерилизуют в автоклаве при пониженном давлении (0,5 атм) при температуре от 110° до 112°C. Так как стерилизация в автоклаве производится при повышенном давлении, то работать с ним могут лишь специально обученные работники, имеющие допуск, т.е. лаборанты лаборатории. Студенты могут только ознакомиться с работой автоклава.

4. Печь Пастера или сушильный шкаф для стерилизации стеклянной посуды, ваты, марли и т.д. В нем стерилизуют сухим жаром при 160...170°C 1,5 ч. Показателем достаточной стерилизации является легкое пожелтение бумаги, в которую завернуты стерилизуемые предметы.
5. Бактерицидная лампа (БУВ - 15, БУВ- 30) для стерилизации воздуха в помещении лаборатории после работы с микроорганизмами.
6. Холодильник для хранения музейных культур микроорганизмов и ряда питательных сред.
7. Сейф для хранения патогенных культур микроорганизмов, ядовитых соединений.
8. Боксовая комната или бокс для пересева музейных культур. Бокс – это небольшое замкнутое пространство, где нет движения воздуха и стерилизация воздуха осуществляется бактерицидной лампой. Бокс хорошо обеспечивает условия стерильности, необходимые для посева чистых культур, так как исследователь через специальное отверстие бокса (рукав) просовывает в него только руки и осуществляет все посеvy, проводя манипуляции над зажженной в боксе спиртовкой.
9. Анаэроостаты – приборы для выращивания микроорганизмов без доступа кислорода воздуха. Воздух отсасывается из них с помощью насосов. Контролируют давление по манометру.
10. Аппарат Коха для дробной стерилизации, водяная баня, рН-метр и бактериальные фильтры.
11. Шкафы для посуды и сред.
12. Лабораторные столы, покрытые пластиком для удобства дезинфекции.

### **Оборудование рабочего стола**

1. Микроскоп – для изучения морфологии микроорганизмов.
2. Спиртовки для фиксации препаратов, фламбирования (обжигания) бактериологической петли, пинцета и др., обжигания краев пробирок и колб при работе с последними и поверхности ватно-марлевых пробок.
3. Предметные стекла с луночками и без них, покровные стекла.
4. Набор красителей: генцианвиолет, фуксин, метиленовая синь, раствор Люголя, спирт 96° и др., используемых для окрашивания клеток микроорганизмов, а также песочные часы.



5. Фарфоровая ванночка со стеклянным мостиком – установка для окраски препаратов.
6. Колба с дистиллированной водой и пипеткой для промывания окрашенных препаратов.
7. Лист фильтровальной бумаги для просушивания препаратов после окраски.
8. Кедровое масло для работы с иммерсионным объективом 90×.
9. Восковой карандаш для надписей по стеклу.
10. Салфетка матерчатая для протирания оптических деталей микроскопа (окуляр, конденсор, диафрагма, зеркало, объективы суховоздушные).
11. Салфетка марлевая для удаления масла с иммерсионного объектива после работы.
12. Пробирки с культурами и пустые штативы для пробирок.
13. Чашки Петри – плоские чашки из тугоплавкого стекла, в которые наливаются питательные среды для выращивания микроорганизмов.

## Тема 2. Микроскоп и техника микроскопии

### Контрольные вопросы

1. Устройство микроскопа.
2. Механические детали микроскопа.
3. Оптическая часть микроскопа.
4. Типы объективов и их характеристика.
5. Увеличение микроскопа.
6. Понятие об апертуре.
7. Разрешающая способность микроскопа.
8. Виды аберрации и способы ее устранения.
9. Основные правила работы с микроскопом.
10. Техника работы со спиртовкой, бактериологической петлей, пробиркой и чашкой Петри с культурами микроорганизмов.

### *Устройство микроскопа*

Микроскоп – оптический прибор (“микрос” – малый, “скопо” – смотрю), предназначенный для рассмотрения объектов, невидимых простым глазом. Микроорганизмы имеют чрезвычайно малую величину и размер их измеряется микрометрами (микронами). Один микрометр составляет тысячную долю миллиметра. Рассмотреть их клетки можно только с помощью микроскопа. Однако скопления клеток микроорганизмов, т.е. их колонии на питательных средах, хорошо видны и простым глазом.

Микроскопы бывают электронные, сканирующие, люминесцентные, фазово-контрастные и применяются в зависимости от цели исследования. Наиболее удобным микроскопом для рассмотрения прозрачных объектов в проходящем свете является световой биологический микроскоп (модель МБИ-1), который применяется и в учебных, и в исследовательских лабораториях. Наибольшее увеличение светового микроскопа, с которым вы будете работать, равно  $15 \times 90 = 1350$ .

Микроскоп состоит из 2 частей: механической и оптической.

*Механическая* часть микроскопа включает: штатив, или башмак, подковообразной формы, тубус с револьвером, в котором закреплены объективы, тубусодержатель для переноса микроскопа, предметный столик для передвижения препарата, макро- и микровинты для фокусирования объектива. Один полный оборот барабана микровинта соответствует перемещению тубуса на 0,1 мм.

*Оптическая часть* микроскопа включает осветительный аппарат (конденсор, диафрагма, зеркало) и собственно оптическую часть (объектив, окуляр). Зеркало отражает падающие на него лучи света и направляет их в конденсор для освещения препарата. Для работы с конденсором обычно применяют плоское зеркало. Вогнутое зеркало используют при искусственном свете, или для малых увеличений при дневном свете, или когда работают без конденсора.

В нашем учебном микроскопе осветительный аппарат вмонтирован в основание микроскопа и лучи света от него поступают непосредственно в конденсор.

*Конденсор* представляет собой систему оптических линз, которые собирают поступающие в него параллельные лучи света в одной точке – фокусе и направляют их на препарат. При этом лучи собираются в виде конуса, направленного вершиной к предметному стеклу. Для хорошего освещения объекта нужно совместить фокус конденсора с плоскостью рассматриваемого препарата. Это достигается вертикальным передвижением конденсора в пределах 20 мм с помощью винта, расположенного сбоку. При опускании конденсора поле зрения микроскопа затеняется, при поднятии – освещается.

*Диафрагма* ирисная (лепестковая) помещена под конденсором. Она служит для регулирования силы света. Окрашенные объекты рекомендуется рассматривать с более открытой диафрагмой, чем неокрашенные. При пользовании иммерсионным объективом и искусственном освещении диафрагму открывают.

*Объективы* составляют самую важную, наиболее ценную и хрупкую часть микроскопа. Объектив состоит из системы линз (до 10 штук), заключенных в металлическую оправу. Главная из них фронтальная линза (самая ближайшая к объекту). Чем больше кривизна этой линзы, тем короче ее фокусное расстояние и больше увеличение объектива и микроскопа. Достоинство объектива характеризуется его собственным увеличением, апертурой, разрешающей способностью и способностью исправлять aberrацию. От увеличения объектива зависят также его характеристики – рабочее расстояние, т.е. расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата и площадь поля зрения. Чем больше увеличение объектива, тем меньше его рабочее расстояние и поле зрения. Увеличение объектива обозначено на его оправе (8×, 10×, 40×, 90×). Объективы с малым увеличением имеют большое рабочее расстояние – 13,8 мм, со средним – 0,6 мм, с сильным – 0,15 мм. При микроскопии препаратов величину рабочего расстояния регулируют микрометрическим или макрометрическим винтами.

Объективы делятся на суховоздушные и иммерсионные (масляные). У суховоздушных объективов между фронтальной линзой и препаратом находится воздух, имеющий коэффициент преломления 1. Из-за разных показателей преломления воздуха и стекла (1,52) в этих объективах часть световых лучей рассеивается.

У иммерсионных объективов между фронтальной линзой и препаратом помещается жидкая среда с показателем преломления, близким к таковому у стекла. У воды показатель преломления 1,33, у глицерина – 1,4, кедрового масла – 1,515. В иммерсионных объективах рассеяние света меньше, чем в суховоздушных, поэтому они дают хорошую освещенность объекта. Увеличение иммерсионных объективов, название жидкости, в которую они должны погружаться, указаны на их оправе. Например, ВИ-40× – водная иммерсия, увеличение 40; ГИ-40× – глицериновая иммерсия, увеличение 40; МИ-90× – масляная иммерсия, увеличение 90.

Кроме увеличения на объективах указана их *апертура* (охват линзы). Апертура увеличивается от слабых объективов (0,02 – 0,25) к средним (0,3 –

0,65) и сильным (0,7 – 1,60). Под апертурой понимают произведение синуса половины угла, под которым свет может попасть в объектив, на показатель преломления среды, находящейся между предметным стеклом и фронтальной линзой объектива. У суховоздушных объективов показатель преломления равен 1, значит их апертура будет выражаться только значением синуса половины угла лучей, входящих в объектив. Например, если имеется объектив, в который попадает свет под углом  $80^\circ$ , то синус половины этого угла ( $40^\circ$ ) будет равен 0,464. При пользовании суховоздушным объективом апертура будет равна 0,64. Числовая апертура при использовании водного объектива будет равна  $0,64 \times 1,33 = 0,85$ . Светособирательная способность масляного объектива больше. При использовании этого объектива максимальным углом попадания света  $120^\circ$  мы получим синус половины угла ( $60^\circ$ ), равный 0,87. Числовая апертура для водного объектива при этом будет  $0,87 \times 1,33 = 1,15$ , а для масляного –  $0,87 \times 1,515 = 1,31$ .

При освещении объекта необходимо учитывать и апертуру конденсора. При работе с суховоздушными объективами, имеющими небольшую апертуру, надо прикрыть ирисовую диафрагму конденсора. Это устранил лишнее рассеивание света и даст нужный контраст изображения. При работе с иммерсионным объективом диафрагма конденсора должна быть максимально открытой, так как его линзы короткофокусные и собирают световые лучи на близком от него расстоянии.

*Разрешающая способность объектива* – очень важная характеристика, от которой зависит разрешающая способность микроскопа. Это наименьшее расстояние между двумя точками объекта, когда они рассматриваются отдельно. У объектива она прямо пропорциональна его числовой апертуре (на объективах она всегда указывается) и обратно пропорциональна длине световой волны, используемой для наблюдения. Средняя длина волны для восприятия глазом равна 0,55 мк, а апертура у каждого объектива своя. Разделив длину волны света 0,55 на апертуру, получим разрешающую способность. Для объектива с числовой апертурой 0,65 она равна  $0,55/0,65 = 0,85$  мк, т.е. можно увидеть детали строения объекта, превышающего по своим размерам 0,85 мк. Совсем другой результат получится с объективом 90 и числовой апертурой 1,25. Наименьшая видимая структура будет  $0,55/1,25 = 0,44$  мк.

*Аберрация.* Любое увеличение изображения предмета при помощи линз со сферическими поверхностями имеет 2 недостатка:

1. Точка объекта имеет вид кружочка, а не точки – это сферическая аберрация, связанная со свойством линз неравномерно преломлять краевые и центральные лучи.
2. Изображение имеет окраску – это хроматическая аберрация, связанная с тем, что при прохождении через линзу пучка лучей с различной длиной волны отдельные лучи, преломляясь в разной степени, пересекаются не в одной точке.

Для устранения aberrаций готовят специальные объективы: ахроматы, апохроматы и планахроматы. На таких объективах имеется специальное обозначение (А, АПО, ПЛАН).

Окуляр состоит из 2 линз: верхняя линза называется глазной, обращенная к объективу – собирающей. Увеличение окуляра указано на его оправе 5×, 7×, 10×, 15×.

Увеличение микроскопа определяется произведением увеличения окуляра на увеличение объектива.

### ***Основные правила работы с микроскопом***

1. Поместить на предметный столик микроскопа предметное стекло с готовым препаратом и закрепить его боковыми зажимами. Установить правильное освещение объекта.
2. Рассмотреть препарат при суховоздушных объективах с малым увеличением (8×), поставив объектив на расстоянии около 1,5 см от предметного столика, и отыскать наилучшее поле для дальнейшего исследования.
3. Подняв тубус микроскопа, нанести небольшую каплю кедрового масла на препарат, установить иммерсионный объектив.
4. Под контролем глаза, глядя сбоку, тубус микроскопа осторожно опустить вниз, чтобы фронтальная линза объектива слегка погрузилась в кедровое масло.
5. Глядя в окуляр, медленно поднять тубус микроскопа макровинтом до появления объекта в поле зрения.
6. С помощью микровинта уточнить фокус, получить резкость изображения. Передвигая столик, найти лучшее поле зрения.
7. Изучить и зарисовать препарат.
8. Тубус поднять, повернуть револьвер на нейтральное положение, иммерсионный объектив тщательно протереть марлевой салфеткой (сухой или смоченной чистым бензином) до полного снятия масла.
9. Препарат поместить в сосуд с дезраствором, микроскоп закрыть чехлом.

### ***Техника работы со спиртовкой, бактериологической петлей, пробиркой и чашкой Петри, с культурами микроорганизмов***

Спиртовку зажигать только с помощью спички. Зажигать спиртовку от другой спиртовки, передавать зажженную спиртовку со стола на стол категорически запрещается. Перед тем как зажечь спиртовку, необходимо снять колпачок и подвигать фитиль, чтобы удалить скопившиеся пары спирта в спиртовке. После работы спиртовку погасить, плотно завинтив колпачком горловину.

Бактериологическую петлю используют для посева микроорганизмов на питательные среды, для приготовления мазков -препаратов. При взятии культур с жидкой питательной среды лучше пользоваться стерильной пипеткой. Петлю готовят из платины или нихрома, т.е. быстро остывающих материалов. Петлю фламбируют (обжигают в пламени спиртовки) до и после ее использования.

Петлю берут в правую руку как карандаш, прокаливают сначала вертикально, чтобы равномерно раскалилась на всем протяжении, затем горизонтально до покраснения. Петлю фламбируют в верхней части пламени спиртовки, где наиболее высокая температура (от 600 до 1500°C). Прокаливают 5 – 7 секунд. Особенно тщательно фламбируют место крепления самой петли в петледержателе. Если в петле после работы осталось заметное на глаз содержание культуры микроорганизма, ее фламбирование нужно начинать с петледержателя, т.е. сначала горизонтально, чтобы культура в петле слегка подсохла, тогда при прокаливании петли вертикально не будет наблюдаться разбрызгивания микробной суспензии и загрязнения воздуха. После работы петлю ставят в стакан петледержателем вниз.

*Работа с пробиркой.* Микроорганизмы выращивают на питательных средах, разлитых в пробирки, чашки Петри или специальные матрацы. Для того, чтобы взять микроорганизмы с твердой или жидкой питательной среды в пробирке, берут пробирку в левую руку, положив ее между большим и указательным пальцем отверстием вверх, подносят к пламени спиртовки. Большим и указательным пальцем правой руки держат прокаленную петлю, мизинцем правой руки открывают над пламенем спиртовки пробку пробирки и прижимают ее к ладони. Вводят петлю внутрь пробирки и охлаждают её у внутренней поверхности стенки пробирки, иначе горячая петля повредит клетки микроорганизмов. Можно остужать петлю, прикоснувшись к питательной среде в пробирке. Затем петлей прикасаются к штриху, по которому растут микроорганизмы на питательной среде, и берут в петлю культуру объемом с маковое зернышко. Петлю вынимают, не касаясь стенок пробирки (взятые микроорганизмы можно использовать для приготовления мазка - препарата или для посева в другую пробирку). Края пробирки обжигают в пламени спиртовки и закрывают её над пламенем спиртовки. При посеве микроорганизмов в другую пробирку с твердой стерильной питательной средой другую пробирку также открывают в пламени спиртовки и легким движением петли с культурой, не повреждая поверхности твердой среды, делают посев зигзагообразный или прямой линией. При посеве в жидкую среду с культурой петлю погружают в среду и слегка встряхивают. Пробирку с вновь посеянными микроорганизмами закрывают в пламени спиртовки, подписывают и ставят в термостат для выращивания.

Категорически запрещается при взятии микроорганизмов из пробирки или при их посеве, т.е. во время любой манипуляции с микроорганизмами, класть пробку, петлю, открытую пробирку на рабочий стол.

*Работа с чашкой Петри.* Если культура микроорганизмов выращена в чашке Петри с твердой питательной средой, чашку ставят на стол, рядом с пламенем спиртовки, левой рукой слегка приподнимают крышку так, чтобы в образовавшееся отверстие свободно проходила петля. Лёгким прикосновением к поверхности среды остужают обожженную петлю и берут со штриха или из колонии (скопления клеток микроорганизмов) культуру объемом с маковое зернышко. Чашку закрывают, а микроорганизмы используют либо для приготовления мазка, либо для посева на питательную среду в другой чашке или пробирке. При распределении суспензии микроорганизмов на поверхности твердой

питательной среды в чашке Петри получают чистые культуры микроорганизмов, т.е. изолированные колонии. Более стерильные (чистые) посевы получают, если чашку Петри держать на ладони левой руки на уровне пламени спиртовки, слегка приоткрывая крышку большим пальцем и мизинцем левой руки. Посев легкими круговыми движениями проводится шпателем (стеклянной палочкой) путем распределения суспензии микроорганизмов по всей поверхности среды в чашке.

### Самостоятельная работа

1. Изучить устройство микроскопа, назначение отдельных его частей.
2. Отработать приемы микроскопии в сухом и иммерсионных объективах.
3. Промикроскопировать готовые окрашенные препараты микроорганизмов разных форм (бактерии, бациллы, кокки, извитые, дрожжи и др.).
4. Сделать записи и зарисовки в тетради.
5. Показать увиденные микроорганизмы и их зарисовки преподавателю.

### Задание на дом

1. Выучить морфологию и структуру клеток эукариотов и прокариотов. (Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. 1978, 1980).
2. Рассчитать предел разрешающей способности микроскопа при работе с объективами:
  - 90×
  - 40×
  - 20×
  - 8×
3. С учетом величины рабочего расстояния объективов определить, каким винтом следует пользоваться при фокусировке объективов:
  - 90×
  - 40×
  - 20×
  - 8×
4. Определить увеличение микроскопа при использовании:
  - окуляра 10×, объектива 8×
  - окуляра 7×, объектива 40×
  - окуляра 10×, объектива 90×
  - окуляра 15×, объектива 90×
5. Рассчитать числовую апертуру водного, глицеринового и масляного объективов при попадании света под углом 90°.
6. Каким должно быть положение конденсора и диафрагмы при использовании иммерсионного или суховоздушного объективов?
7. Ответы на задания 2-6 записать в лабораторной тетради.

# ЗАНЯТИЕ 2

## Тема 3. Общая бактериологическая техника

### Оснащение занятия

Такое же, как и для занятия 1, а также предметные стекла с луночкой, вазелин и покровные стекла, суточные культуры сенной палочки, кишечной, кокков, дрожжей.

### Контрольные вопросы

1. Правила приготовления мазка-препарата.
2. Простые методы окраски.
3. Сложные методы окраски.
4. Сущность окраски по Граму.
5. Характеристика спор.
6. Окраска спор по Пешкову.
7. Изучение микроорганизмов в живом состоянии.

### *Правила приготовления мазка-препарата*

Морфологию микроорганизмов изучают в живом состоянии и в окрашенных препаратах.

Существуют простые и сложные методы окраски. При простом методе окраски используется один краситель (фуксин, метиленовая синь, генцианвиолет и др.). При сложном методе окраски одновременно используются несколько разных красителей.

При любом способе окраски мазок - препарат готовят следующим образом:

1. Обезжирить предметное стекло, натерев его с обеих сторон кусочком хозяйственного мыла и протерев затем сухой салфеткой, так как только на обезжиренном стекле суспензия микроорганизмов хорошо растекается. Чаще всего обезжиривание предметных стекол проводят абсолютным спиртом или в смеси равных объемов спирта и эфира. Кладут стекло перед собой на темную поверхность (на стол).
2. Обожженной петлей на середину стекла нанести 2-3 капли физиологического раствора или суспензию культуры с жидкой среды.
3. С косога агара или с другого субстрата профламбированной бактериологической петлей взять культуру объемом с маковое зернышко и внести в каплю физиологического раствора. Взятие культуры из пробирки производят над пламенем спиртовки.
4. Размазать культуру тонким слоем по стеклу овалом не более 2 см<sup>2</sup>. Обжечь петлю и поставить в стакан. Обвести место мазка восковым карандашом, снизу стекла.
5. Мазок высушить на воздухе.



6. Зафиксировать сухой мазок. Существуют 2 метода фиксации: термический и химический (спиртом, парами осмиевой кислоты и др.). Самым распространенным является термический метод, когда мазок фиксируют над пламенем горелки в течение 3 с. Стекло проводят над верхним пламенем спиртовки круговыми движениями 3-4 раза мазком вверх. Надежность фиксации проверяют, приложив стекло к тыльной стороне ладони – стекло должно быть теплым. В случае перегрева морфология бактерий исказится, так как произойдет свертывание белка, а в случае недогрева мазок смоеется со стекла при дальнейших манипуляциях. Фиксация необходима, чтобы убить микроорганизмы и сделать их безопасными для работы; закрепить микроорганизмы на стекле, чтобы они не смылись затем при окраске; мертвые клетки лучше воспринимают окраску, чем живые.
7. Покрасить простым или сложным методом.
8. Мазок высушить между листами фильтровальной бумаги.
9. Рассмотреть препарат в микроскоп при сухих объективах.
10. Капнуть на мазок каплю кедрового масла или глицерина.
11. Рассмотреть в микроскоп через иммерсионный объектив.

### ***Простые методы окраски***

Для окраски клеток микроорганизмов наиболее пригодными являются анилиновые краски (основные и нейтральные). При простом методе окраски приготовленный и зафиксированный мазок-препарат размещают над ванночкой на стеклянном мостике, мазком вверх. Из капельницы на мазок наносят одну анилиновую краску (синьку Леффлера или фуксин) и оставляют её на препарате 2-4 мин. Краситель можно налить и не прямо на мазок, а на кусочек фильтровальной бумаги, размещенной на мазке. Окраска получается чище. Через 2-4 мин смывают краску с препарата тонкой струёй воды и высушивают препарат между листами фильтровальной бумаги. Затем мазок микроскопируют с применением иммерсии. При простых методах окраски можно увидеть форму и расположение микроорганизмов, их относительные размеры, наличие капсул.

*Капсула* – это слизистый слой, окружающий клетки отдельных бактерий. Она является продуктом жизнедеятельности клетки и состоит из различных полисахаридов или полипептидов. Капсула служит средством защиты или запасным питательным материалом клетки.

Наиболее распространена окраска капсул по методу Михина. На фиксированный препарат наносят метиленовую синь и красят ею в течение 3 мин при подогревании. Краску сливают, промывают препарат водой, просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют с иммерсией. Тело клеток окрашивается в синий цвет, капсула – почти бесцветна или бледно-розовая.

### ***Сложные методы окраски***

Для дифференциации микроорганизмов и изучения их клеточной структуры применяются сложные методы окраски, например, окраска по Граму или окраска спор.

Впервые в 1884 г. датский физик Х.Грам предложил использовать сложный метод окраски, основанный на разной восприимчивости бактерий к одним и тем же красителям. Этот метод применяется широко и в настоящее время и называется методом окраски по Граму.

Сущность окраски по Граму заключается в том, что краски трифенилметанового ряда (например, генцианвиолет, метилвиолет и др.) при соединении с йодом в присутствии магниевой соли рибонуклеиновой кислоты, мукополисахаридов и полифосфатнуклеотидов, которые содержатся в наружном слое цитоплазмы и клеточной стенке бактерий, образуют комплекс, плохо растворимый в спирте. К таким бактериям относятся грамположительные бактерии «Г+» (кокки, бациллы, актиномицеты, молочно-кислые бактерии, дрожжи). Клеточная стенка у этих бактерий состоит из многослойного муреина (мукополисахарида и полифосфатнуклеотиды), содержание которого колеблется от 50 до 95%. После окраски их генцианвиолетом и обработки раствором Люголя (йод в водном растворе йодистого калия) они сохраняют фиолетовый цвет (цвет генцианвиолета), несмотря на дополнительную обработку спиртом.

У грамотрицательных «Г-» бактерий клеточная стенка состоит из однослойного муреина. Его содержание колеблется от 5 до 12%. Генцианвиолет и йод не образуют с ним прочного соединения, и образующиеся комплексы легко вымываются из клетки спиртом. Такие бактерии обесцвечиваются спиртом и дополнительно докрашиваются фуксином, приобретая розовый цвет. К грамотрицательным бактериям относятся кишечная палочка, сальмонеллы, бруцеллы и др.

Таким образом, различное отношение бактерий к окраске по Граму зависит от количества муреина и его локализации в клеточной стенке.

### *Техника окраски по Граму*

1. Подготовить и зафиксировать мазок из смеси кишечной палочки и дрожжей.
2. На фиксированный мазок нанести полоску фильтровальной бумаги, пропитанной генцианвиолетом, и накапать на неё 3-5 капель воды, выдержать 2 мин.
3. Бумагу удалить обратным концом спички или пинцетом, препарат промыть по ребру стекла водой и залить раствором Люголя на 2 мин.
4. Промыть препарат водой.
5. Нанести спирт на препарат не более чем на 30 с - 1 мин. Время обесцвечивания мазка соблюдать особенно тщательно. Передержка и недодержка спирта на препарате приведет к искажению результатов.
6. Промыть препарат водой.
7. На мазок нанести полоску фильтровальной бумаги, пропитанной фуксином Пфейфера, и накапать на неё 3-5 капель воды. Выдержать 2 мин.
8. Бумажку убрать, фуксин хорошо смыть водой.
9. Мазок высушить между листами фильтровальной бумаги.
10. Провести микроскопию препарата с применением иммерсии. «Г+» бактерии окрасятся в фиолетовый цвет, «Г-» бактерии - в красный. Чтобы

получить правильную окраску по Граму, рекомендуется употреблять для окраски суточные культуры микроорганизмов.

### **Характеристика и окраска спор**

Споры – блестящие, округлые или овальные образования, лежащие внутри клеток бактерий. В одной бактериальной клетке образуется только одна спора. Спора у бактерий является средством сохранения вида, а не способом размножения. Спора в клетке образуется при неблагоприятных условиях внешней среды: истощении среды, действии неблагоприятной температуры, степени аэрации и др.

Спорообразование начинается с концентрации наследственного материала клетки в одном участке и формирования вокруг него многослойных оболочек споры. Содержимое клетки теряет много воды и в споре её остается не более 40%. Исключительной плотностью оболочек споры и минимальным содержанием воды, а также особенностями физико-химического состава объясняется высокая устойчивость споры к внешним воздействиям. В споре содержится хелатный комплекс кальция и дипиколиновой кислоты (его нет в вегетативных клетках), много липидов, солей кальция, магния, калия, фосфора. Они устойчивы к высушиванию, кипячению, выдерживают нагревание сухим жаром (150-160°C) несколько часов, поэтому во внешней среде могут сохраняться десятилетиями (особенно в почве).

В зависимости от расположения в бактериальной клетке и величины споры различают следующие типы бацилл:

1. Истинные бациллы (*Bacillus*), когда диаметр споры меньше или равен диаметру вегетативной клетки. Бактерия при спорообразовании независимо от места локализации споры не меняет форму. Например, сенная палочка (*Bacillus subtilis*), картофельная палочка (*Bacillus mesentericus*) и др.
2. Клостридии (*Clostridium*), когда диаметр споры больше диаметра самой клетки и клетка при спорообразовании приобретает вид веретена. Например, анаэробный фиксатор азота *Clostridium pasteurianum*.
3. Плектридии (*Plectridium*), когда спора располагается на конце клетки и по диаметру она больше клетки, что создает впечатление барабанной палочки. Например, *Plectridium pectinovorum*, возбудитель брожения пектиновых веществ.

### **Особенности окраски спор**

При обычных методах окраски споры не окрашиваются благодаря большой плотности и слабой проницаемости их многослойной оболочки. Для окраски спор применяют сложные методы. Чтобы размягчить оболочку спор, используют протравливание мазка перед окраской раствором кислот, а для окраски употребляют концентрированные красители (карболовый фуксин) и подогревание. Споры окрашиваются труднее, чем цитоплазма клетки, но и при обесцвечивании они с большим трудом отдают адсорбированную краску. Поэтому все предложенные способы окраски спор основаны на одном и том же принци-

пе: сначала сильно перекрашивают препарат, частично обесцвечивают его, отнимая краску у клетки и оставляя её у споры, затем окрашивают клетки в дополнительный цвет.

Существует несколько методов окраски спор, но мы остановимся на методе, предложенном Пешковым (табл.1-2).

#### *Техника окраски спор по Пешкову*

1. Приготовить и зафиксировать мазок из 3 -суточной культуры спорообразующих бактерий на пламени горелки.
2. На фиксированный мазок пипеткой наливать раствор щелочной метиленовой сини.
3. Препарат, покрытый синью, держать над пламенем спиртовки, доводя его до кипения (появления паров) и кипятить 15-20 с.
4. Смыть синьку водой.
5. Докрасить препарат 0,5%-м водным раствором нейтральрота в течение 30 с.
6. Промыть дистиллированной водой.
7. Препарат высушить между листами фильтровальной бумаги и микроскопировать с иммерсионным объективом.
8. После окраски споры приобретают голубую или синюю окраску, а цитоплазма клетки становится розовой.

#### *Изучение микроорганизмов в живом состоянии*

Препараты, приготовленные из живых микробов, используются для определения формы клеток, наблюдения за подвижностью микробов, их размножением, спорообразованием, хемотаксисом. Для этого готовят препараты “раздавленная капля” и “висячая капля”.

**Таблица 1. Окраска фиксированного мазка-препарата по Граму**

Фаза	Краски, реактивы	Время действия	Процесс
1	Генцианвиолет (смывают водой)	2 мин	Окрашиваются все бактерии (грамположительные и грамотрицательные)
2	Раствор Люголя (стряхивают, можно промыть водой)	2 мин	Образуется комплекс: нерастворимый у грамположительных и труднорастворимый у грамотрицательных
3	Спирт 96 <sup>0</sup> (смывают водой)	30 с	Обесцвечиваются грамотрицательные бактерии
4	Фуксин (смывают водой)	1 мин	Окрашиваются грамотрицательные бактерии

*Примечание:* Препарат высушивают между листами фильтровальной бумаги и рассматривают с иммерсией в микроскоп.

**Таблица 2. Окраска спор по Пешкову**

Фаза	Краски, реактивы	Время действия	Процесс
1	Метиленовая синь	Кипятят 15-20 с над пламенем спиртовки	Окрашиваются споры и цитоплазма клетки
2	Смывают водой		Цитоплазма обесцвечивается
3	Нейтральрот 0,5%-й (смывают водой)	30 с	Цитоплазма окрашивается

*Примечание.* Мазок высушивают между листами фильтровальной бумаги и исследуют под микроскопом. После окраски споры приобретают голубую или синюю окраску, а цитоплазма клетки становится розовой.

**Раздавленная капля.** На середину чистого обезжиренного предметного стекла петлей или стерильной пипеткой наносят маленькую каплю взвеси микробов в физрастворе (если препарат готовят из культуры, взятой с плотной питательной среды) или бульонной культуры. Рядом с каплей на ребро ставят чистое покровное стекло и постепенно опускают его на каплю. В правильно сделанной капле под покровным стеклом не должно быть пузырьков воздуха, мешающих микроскопированию. Удачно сделанная капля должна заполнять все пространство между предметным и покровным стеклами, но не выходить за края последнего. Если же капля выходит за пределы покровного стекла, фильтровальной бумагой снимают лишнюю влагу и эту бумагу опускают в дезраствор. Препарат исследуют суховоздушными объективами наибольшего увеличения (40×, 60×) в затемненном поле зрения, т.е. при опущенном конденсоре и суженной диафрагме. Бактерии, имеющие жгутики, активно движутся, проплывая через все поле зрения. Монотрихи с одним жгутиком движутся в одном направлении, перитрихи совершают вращательные или круговые движения. Бактерии без жгутиков совершают беспорядочное колебательное движение, обусловленное броуновским движением.

**Висячая капля.** Препарат изготавливают из бульонной культуры или водной взвеси микробов. При этом суспензия микроорганизмов не должна быть густой. Обезжиренные предметное стекло с луночкой и покровное стекло фламбируют

в пламени спиртовки. Вокруг лунки по краям наносят тонкий слой вазелина. В центре покровного стекла помещают петлей или микропипеткой (пастеркой) небольшую каплю культуры. Предметное стекло держат лункой вниз и, плотно прижимая к покровному стеклу, так, чтобы капля находилась в середине лунки, быстро (но осторожно) переворачивают. Капля должна свободно свисать, но не соприкасаться с дном и краями лунки. Покровное стекло при этом вазелином склеивается с предметным и создается влажная, герметически закрытая камера, где капля долго не высыхает, что обеспечивает возможность длительного наблюдения.

Если капля растеклась по выемке и вышла за её края, то препарат готовят заново. Препарат рассматривают под малым увеличением микроскопа в затемненном поле зрения при суженной диафрагме и опущенном конденсоре. Найдя край капли и уточнив фокус, можно рассматривать препарат через объективы 40×, 60× и окуляр 15.

### Самостоятельная работа

1. Приготовить мазок-препарат из суточных культур кишечной палочки и кокков или из кишечной и сенной палочек. Окрасить препарат по Граму. Можно взять кишечную палочку и дрожжи.
2. Приготовить мазок-препарат из 3-суточной культуры сенной палочки. Окрасить споры по способу Пешкова.
3. Промикроскопировать препараты с иммерсией. Показать преподавателю.
4. Сделать записи и зарисовки в тетради.
5. Подготовить препарат «висячая капля» из суточной культуры сенной палочки. Пронаблюдать подвижность бактерий и определить характер их жгутикования.
6. Показать микроорганизмы и их зарисовки преподавателю.

### Задание на дом

1. Изучить группу бактерий (Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. – 1978, 1980 ).
2. Определить простые и сложные методы окраски:
  - *Способ Ольта* для окраски капсул. На мазок налить свежеприготовленный 3%-й раствор сафранина и покрасить при подогревании 3 минуты. Микроскопировать с иммерсией. Микроскопическая картина – тела бактерий красные, капсулы – желтые.
  - *Способ Ружичка* для прижизненного окрашивания клетки. Приготовить смесь равных объемов 0,5%-х водных растворов нейтральрота и метиленовой сини. Несколько капель смеси нанести на предметное стекло и высушить. На высушенный мазок краски нанести каплю взвеси микроорганизмов и закрыть покровным стеклом. Клетки постепенно окрашиваются.
3. Перечислить микроорганизмы, которые имеют споры или жгутики:

- монококки
- стрептококки
- сарцины
- стафилококки
- бактерии
- бациллы
- спириллы
- клостридии
- спирохеты
- плектридии.

Ответы на задания 2 - 4 записать в тетради.

4. Изучить размеры клеток микроорганизмов, перечисленных в табл. 3.

5. Рассмотреть способы размножения микроорганизмов (см. табл. 3).

Распределить перечисленные в табл. 3 формы микроорганизмов на 2 группы согласно их основному морфологическому признаку.

**Таблица 3. Классификация микроорганизмов по морфологии**

<i>Микроорганизмы</i>	<i>Одноклеточные</i>	<i>Многоклеточные</i>	<i>Прокариоты</i>	<i>Эукариоты</i>
<i>Бактерии</i>				
<i>Диплококки</i>				
<i>Вибрионы</i>				
<i>Бациллы</i>				
<i>Дрожжи</i>				
<i>Стрептококки</i>				
<i>Водоросли синезелёные</i>				
<i>Грибы</i>				
<i>Сарцины</i>				
<i>Клостридии</i>				
<i>Актиномицеты</i>				
<i>Микоплазмы</i>				
<i>Стафилококки</i>				

# ЗАНЯТИЕ 3

## Тема 4. Питательные среды, стерилизация

### Оснащение занятия

1. Студент должен иметь чашку Петри, пробирку, пипетку, шпатель и полоски бумаги для их обертывания, иглу, вату, спиртовку, спички.
2. Подгруппа в (15 человек) должна иметь набор естественных, искусственных и синтетических питательных сред: молоко, мясную воду, МПА, МПБ, среду Чапека, среду Гетчинсона, КАА, Эндо, аппарат Зейтца, анаэроустат, марлю, нитки, ножницы.

### Контрольные вопросы

1. Требования, предъявляемые к питательным средам.
2. Типы питательных сред.
3. Понятие о стерилизации.
4. Методы стерилизации.

Изучать различные свойства микроорганизмов, их обмен веществ можно только в условиях, когда они могут расти, размножаться и проявлять свои жизненные функции. Это достигается при выращивании микроорганизмов на соответствующих питательных средах. При составлении питательных сред необходимо учитывать потребности микроорганизмов в элементах питания, их наличие в среде в форме, доступной для микроорганизмов. Одновременно среда должна удовлетворять всем требованиям для обитания микроорганизмов, позволяющим осуществлять свойственный данной группе микроорганизмов обмен веществ. Для роста микроорганизмов в состав питательной среды должны входить элементы-органогены (углерод, азот, водород, кислород), зольные элементы (фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо), микроэлементы (цинк, медь, кобальт, бор, марганец, молибден, стронций) и витамины.

Потребность в перечисленных элементах у различных микроорганизмов неодинакова. Поэтому не может быть одной универсальной питательной среды, одинаково удовлетворяющей потребности всех микроорганизмов.

Потребности в кислороде и водороде микроорганизмы удовлетворяют главным образом за счет поступающей в клетку воды. В качестве источника азота и углерода в составе питательных сред могут быть использованы органические или минеральные соединения. Соединения углерода и азота являются основными компонентами питательных сред. Именно они определяют специфичность подавляющего большинства питательных сред.

Микроорганизмы делят по способности к усвоению разных форм азота на *аминоавтотрофы* и *аминогетеротрофы*. Аминоавтотрофы извлекают азот из простых минеральных соединений или используют азот атмосферы. Они сами синтезируют все аминокислоты. Для них готовят питательные среды либо совсем без азота, либо азот дают в виде аммонийных и нитратных солей.



Аминогетеротрофы для построения белков своего организма нуждаются либо в готовых аминокислотах, либо в присутствии белка, либо расщепляют высокомолекулярные продукты разложения белка – пептоны. Белки, пептоны и аминокислоты они могут использовать не только как источник углерода, но и как источник энергии.

По потребности в углероде микроорганизмы делятся на *автотрофы* и *гетеротрофы*.

Автотрофы способны использовать углерод из углекислого газа воздуха или из карбонатов и синтезировать из него углеводы клетки. Для них готовят питательные среды с карбонатами или совсем без источника углерода.

Гетеротрофы используют углерод из готовых органических соединений. Поэтому в питательные среды для них добавляют разнообразные углеродсодержащие вещества. Наиболее полноценным источником углерода для гетеротрофов являются сахара (глюкоза, галактоза, лактоза, сахароза, арабиноза), многоатомные спирты (глицерин, маннит, сорбит и др.), карбоновые кислоты и оксикислоты (молочная, яблочная и др.)

### ***Требования, предъявляемые к питательным средам***

1. Должна содержать все необходимые для данного микроорганизма элементы питания (органогены, зольные, микроэлементы) и витамины.
2. Иметь достаточную влажность, так как основную часть микробной клетки (90%) составляет вода, и микроорганизмы усваивают только растворенные питательные вещества. На твердых субстратах (пластмассах и др.) микроорганизмы можно выращивать только при высокой относительной влажности воздуха. Среда долго не хранят, она высыхает.
3. Обладать изотоничностью, т.е. иметь оптимальную концентрацию питательных веществ, идентичную содержимому клеток микроорганизмов (для бактерий примерно 0,5% всех солей, для грибов и актиномицетов – до 3%). В очень разбавленных (гипотонических) или сильно концентрированных (гипертонических растворах) рост микроорганизмов замедляется или прекращается.
4. Не содержать никаких посторонних микроорганизмов, т.е. быть стерильной. С этой целью питательные среды стерилизуют (автоклавировывают, кохируют, фильтруют через бакфильтры) и проверяют на стерильность, выдерживая 2-3 суток в термостатной комнате или термостате при температуре 37°C. Проросшие среды бракуются.
5. Должна быть прозрачной, что обеспечит хорошее наблюдение за ростом колоний микроорганизмов на твердых средах и характером их развития (поверхностный рост, пристеночный и т.д.) на жидких средах. Для создания прозрачности в процессе приготовления среды осветляют, добавляя в них белок куриного яйца, взбитый до пены, с двойным количеством дистиллированной воды, и затем отфильтровывают.
6. Должна иметь соответствующую реакцию среды (рН). Поэтому при приготовлении сред их подщелачивают 20%-м раствором соды или подкисляют органическими (молочной, уксусной, борной) или мине-

ральными кислотами. Для развития бактерий реакция среды должна быть нейтральная (около 7,0), для грибов и дрожжей - кислая (от 4,5 до 6,5) для актиномицетов - нейтральная или слабощелочная (от 7,0 до 7,4). Для некоторых микроорганизмов (пенициллов) рН среды не имеет значения. Они развиваются в широком диапазоне рН (от 1 до 10). Другие микроорганизмы очень чувствительны к рН. Например, холерный вибрион растет в узком диапазоне рН (от 7,2 до 7,4).

7. Иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал, или  $rH$  (отрицательный логарифм содержания молекул водорода). При насыщении среды кислородом  $rH_2$  равен 41, водородом – 0. Аэробы развиваются при  $rH_2$  от 10 до 30, анаэробы от 0 до 10, а факультативные анаэробы – от 0 до 30. Для выращивания аэробов специальных условий не создают. Они хорошо растут на поверхности агаризованных питательных сред или в тонком слое жидких питательных сред. Для культивирования анаэробов в питательные среды вводят компоненты, изолирующие микроорганизмы от наружного воздуха (например, масло), а сами питательные среды наливают высоким столбиком в пробирки или специальные трубки. Можно регулировать  $rH_2$ , добавляя в питательные среды цистеин или гипосульфит в определенных количествах, снижающих аэробность среды. На поверхности агаризованных сред анаэробов можно выращивать в специальных приборах-анаэросторах, из которых откачивается воздух.

### *Типы питательных сред*

В зависимости от **происхождения** питательные среды подразделяют на естественные, искусственные и синтетические.

*Естественными средами* обычно называют такие, которые представляют собой натуральный продукт (молоко, яйца, овощи) или естественный субстрат (вода, свернутая сыворотка крови, растение и т.д.).

*Искусственные среды* готовят по определенным рецептам из различных настоев или отваров растительного или животного происхождения с добавлением в них неорганических солей, углеводов, азотистых соединений.

Естественные и искусственные питательные среды не имеют постоянного состава, на них развиваются многие микроорганизмы, и они мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов. Используются в основном для выделения и поддержания культур микроорганизмов, их диагностики.

*Синтетические среды* готовят по определенным рецептам и только на дистиллированной воде с добавлением химически чистых веществ (соль, углевод, аминокислота, витамин и др.) в определенных количествах. Синтетические среды значительно беднее по питательной ценности искусственных и естественных и часто являются селективными (избирательными) средами для определенных групп микроорганизмов.

**По консистенции** различают питательные среды жидкие, полужидкие, плотные и сыпучие.

*Жидкие среды* состоят из воды и растворенных в ней веществ (мясная вода, мясо-пептонный бульон, среда Виноградского для нитрификаторов). Их применяют для получения биомассы микроорганизмов, их метаболитов, для изучения физиологии и биохимии микроорганизмов, для длительного поддержания коллекции микроорганизмов.

*Плотные искусственные среды* готовят путем добавления к жидкой среде уплотняющих веществ: желатины (белок, получаемый путем вываривания костей, хрящей и сухожилий животных или чешуи рыб) 10-15% или агар-агара 1-2% (полисахарид, пектинообразное вещество, получаемое из морских водорослей). Плотной основой могут служить также пластинки силикагеля, пропитанные питательной средой.

*Полужидкие среды* содержат те же уплотняющие вещества, но в меньшем количестве (0,2-0,3% агар-агара). Плотные и полужидкие среды используют для количественного учета микроорганизмов в разных субстратах, для изучения строения колоний, получения чистых культур и т.д.

*Сыпучие среды* применяют в микробиологической промышленности для изготовления бактериальных удобрений, бактериальных препаратов для защиты растений и т.д. К ним относят отруби, разваренное пшено, кварцевый песок, силикагель, пропитанные питательным раствором.

В микробиологических лабораториях наиболее универсальными являются среды с агар-агаром. Он застывает при 40...50°C, а плавится при 100°C. Хорошо выдерживает разные режимы стерилизации. Однако при стерилизации кислых сред частично гидролизуются и затем не застывают. Поэтому среды подкисляют только после стерилизации, перед розливом твердой агаризованной среды в чашки или пробирки. Желатина имеет то неудобство, что она разжижается при 25°C, т.е. при температуре ниже обычной температуры культивирования многих мезофилов (30...37°C). Поэтому, чтобы установить, есть ли у данного микроорганизма фермент желатиназа, расщепляющий желатину, желатину после определенного срока выращивания микроорганизмов помещают в холодильник для застывания. Это позволяет устранить естественное разжижение желатины.

**По назначению** питательные среды делят на обычные, элективные и дифференциально-диагностические.

К *обычным средам* относят МПА, МПБ, картофельную среду.

*Элективные среды* предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественное развитие определенной группы микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств. Элективные среды введены в практику микробиологических исследований русским микробиологом С.Н.Виноградским. Применяют для выделения большинства почвенных микроорганизмов.

*Дифференциально-диагностические среды* (индикаторные) дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других. Это, например, среда Эндо для кишечной палочки, или, иначе, фуксинсульфитный агар. Она готовится так: к среде МПА после стерилизации добавляют 10 г лактозы на 1 л среды, 4 мл 10%-го спиртового раствора основного фуксина и 10%-го раствора

сульфита до легкого порозовения. После застывания среда должна быть почти бесцветна. Хранить в темноте, на свету она краснеет. Кишечная палочка (*Echerichia coli*) на этой среде образует красные колонии с металлическим блеском.

### ***Использование сухих питательных сред***

Сухие питательные среды в виде порошков необходимо хранить герметически закрытыми и в темноте, так как препараты гигроскопичны и светочувствительны. Изменение их физических свойств (увлажнение, комкование, другой цвет) свидетельствует об ухудшении качества. Наличие в сухой среде глюкозы при изменении цвета порошка- показатель его порчи.

Чтобы приготовить питательную среду из сухого порошка, необходимо навеску, указанную на этикетке, взвесить и высыпать в стеклянную колбу. залить холодной дистиллированной водой. Хорошо размешать до полного смачивания порошка водой. Смесь нагреть в водяной бане до кипения, периодически помешивая. Кипячение ведут до тех пор, пока порошок окончательно не растворится. Можно кипятить до растворения и в колбонагревателе, но необходимо постоянно следить, чтобы не допустить пригорания среды.

Сухой питательный мясо-пептонный агар перед стерилизацией надо освободить от мути. Для этого расплавленную среду наливают в высокий сосуд, затем дают медленно остыть. Муть при этом собирается на дне сосуда. Затем сосуд опускают на некоторое время в горячую воду, агар из него вытряхивают и отрезают мутную часть. Прозрачный агар расплавляют и стерилизуют под давлением 1 атм 20 мин или дробным методом (3 кратная обработка при температуре 100С° в водяной бане в течение 30 мин с последующим ежесуточным проращиванием спор в термостате.

Для приготовления среды Эндо из сухого агарового порошка, содержащего фуксин, но больше ничем по составу не отличающегося от мясо-пептонного агара, делают навеску на определенный объем воды. Агара берут 2% (20 г на 1 л). Навеску в воде взбалтывают до полной смачиваемости и кипятят 3-5 минут, не допуская пригорания. Дополнительной стерилизации не требуется.

Горячий агар Эндо имеет бледно-розовый цвет, при остывании становится почти бесцветным. Среду готовят и разливают в стерильные чашки Петри в день посева. Среду нельзя оставлять на свету, она покраснеет.

### ***Понятие о стерилизации***

Стерилизацией называется полное уничтожение вегетативных клеток бактерий и спор микроорганизмов в том или ином субстрате. Стерилизация означает обеспложивание. Термин "стерильность" имеет абсолютное значение: либо объект стерилен, либо нестерилен, середины быть не может.

Различают термическую и холодную стерилизацию. Термическая стерилизация включает прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровую стерилизацию (горячим воздухом), стерилизацию насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробную стерилизацию (тиндализацию и кохирование), кипячение.

*Холодная стерилизация* включает фильтрование через бактериологические фильтры, обработку ультрафиолетовыми лучами, химическими соединениями, газами.

В каждом отдельном случае приходится избирать такой способ стерилизации, который, давая надежный результат в смысле уничтожения всех микроорганизмов и их спор, не изменял бы в то же время свойства стерилизуемого объекта, не нарушал бы химического состава питательных сред, свойств материала и т.д.

В микробиологической практике в основном применяют термические способы стерилизации, которые также выбирают в зависимости от состава питательных сред, посуды и инструментов.

### ***Методы стерилизации***

*Автоклавирование* – стерилизация насыщенным паром под давлением. Проводится в автоклаве. Выбор режима автоклавирования определяется составом питательных сред. Микробиологи чаще всего стерилизуют при 0,5 и 1 атм. Легко разрушающиеся субстраты, как молоко и желатиновые среды, субстраты, содержащие сахара и витамины (пивное сусло, соки), обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-30 мин. Мясо-пептонные среды стерилизуют при 1 атм 20 мин. Агаризованные среды требуют для стерилизации в 2 раза больше времени, чем такой же объем воды. С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (тальки) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), так как они плохо передают тепло и медленно нагреваются. Их лучше стерилизовать в сухожарочных шкафах. Почву и сильно заспоренные субстраты стерилизуют в автоклаве при 1 атм либо раз 2 ч, либо 2 дня подряд по 1 ч, а иногда при 2 атм 2 ч.

Режим стерилизации зависит от рН среды. При кислой реакции среды наблюдается гидролиз агара и желатины. В результате после стерилизации эти среды не застывают (особенно с желатиной). Если среда щелочная, карамелизуются сахара, выпадают в осадок соли железа. Нейтральные среды с сахарами (особенно ксилозой) при автоклавировании подкисляются до рН 6,0. Чтобы избежать негативных изменений при автоклавировании, рекомендуется углеводы, фосфаты, соли железа автоклавировать отдельно от остальной среды при более мягком режиме и объединять в нужном соотношении после стерилизации.

Режим стерилизации зависит также и от объема материала. Чем больше материал, тем продолжительнее стерилизация при одной и той же температуре.

*Стерилизация текущим паром*, дробная стерилизация применяется для питательных сред, содержащих белки, углеводы (молоко, картофель и др.), которые при автоклавировании изменяют состав. Её проводят в автоклаве с незакрепленной крышкой или в специальном аппарате Коха – металлическом цилиндре, на дно которого наливают воду. Над водой ставят сетку и на неё помещают стерилизуемый материал. Сверху аппарат закрывают крышкой с отверстием. Через него пар свободно выходит наружу. Стерилизуют от 30 мин до 1 ч с момента закипания воды. Погибают только вегетативные формы, а споры сохраняются. Поэтому среду помещают на сутки в термостат с температурой

30°C для проращивания спор. Через сутки стерилизацию текучим паром повторяют, снова проращивают споры и на 3-и сутки еще раз стерилизуют.

Дробная стерилизация текучим паром в течение 30-60 мин в течение 3 суток с обязательным проращиванием спор в промежутках между прогреваниями среды называется *кохированием*.

Разновидностью дробной стерилизации является *тиндализация*. В аппарате Коха или в водяных банях стерилизуют вещества, легко разрушающиеся при температуре свыше 60°C. Прогревание проводят при 56...58°C в течение 1 ч с 5-6-кратным повторением через каждые 24 ч. В промежутке между прогреванием среды выдерживают при температуре 25... 37°C.

*Пастеризация* – это одномоментный прогрев при температуре 60...70°C в течение 30 мин или 75...80°C в течение 5-10 мин. Введена Пастером для уничтожения вегетативных клеток, преимущественно патогенных микробов. Споры формы микроорганизмов сохраняются. Применяют для частичного обеспложивания молока, пива, вин и других продуктов. В пастеризованных продуктах сохраняются витамины и вкусовые качества. Длительному хранению не подлежат.

*Стерилизация фильтрованием через бактериальные фильтры*. Эти фильтры имеют очень мелкие поры. Микробные клетки задерживаются на фильтре, а вытекающая после фильтрации жидкость оказывается стерильной. Клетки микробов на фильтре задерживаются главным образом механически, так как их диаметр больше диаметра пор фильтра, а также потому, что поры идут через фильтр извилисто и на разном протяжении имеют разную форму и размер. Фильтры, приготовленные из положительно заряженного материала, еще и притягивают бактерии к стенкам пор, поскольку большинство бактерий в водной суспензии несет на своей поверхности отрицательный заряд.

Бактериальные фильтры изготовляют из разных материалов: на основе нитроцеллюлозы (мембранные фильтры), асбестовые фильтры (из асбеста с целлюлозой), фарфоровые фильтры, фильтры из инфузорной земли, фильтры из стекла.

Наиболее распространенные методы стерилизации приведены в табл. 4

**Таблица 4. Методы стерилизации**

<i>Метод стерилизации</i>	<i>Фактор стерилизации</i>	<i>Стерилизуемый объект</i>
<b>Физические</b>		
<b>Фламбирование</b>	<i>Температура от 600 до 1500°C, приводящая к обугливанию микробов</i>	<i>Бактериологическая петля, пинцет, скальпель, игла, края пробирок, поверхности пробок</i>
<i>Кипячение в воде или с добавлением 2%-го раствора карбоната натрия</i>	<i>Температура 100°C в течение нескольких часов, с содой – 15-30 мин</i>	<i>Хирургические инструменты, резиновые груши, шприцы, трубки</i>
<i>Сухим жаром в сушильном шкафу (печи Пастера)</i>	<i>Температура 160...170°C в течение 1 ч или 150°C в течение 2 ч</i>	<i>Стеклянная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри), вата</i>
<b>Дробная стерилизация текучим паром</b>		

<i>Кохирование (трехкратное повторение нагревания через каждые 24 ч)</i>	<i>Температура 100°C в течение 30-60 мин с последующим проращиванием спор</i>	<i>Питательные среды Гисса с сахарами, молоко, желатина</i>
<i>Тиндализация (5-6 - кратное повторение нагревания через каждые 24 ч)</i>	<i>Температура 52...58°C в течение 60 мин с последующим проращиванием спор</i>	<i>Витамины, лекарственные препараты</i>
<i>Химические</i>		
<i>Фенол (3-5%-й раствор карболовой кислоты)</i>	<i>Поврежденные белки цитоплазм обладают максимальной поверхностной активностью</i>	<i>Предметные стекла с мазками микробов, посуда после культивирования микробов</i>
<i>Формалин (40%-й раствор формальдегида)</i>	<i>Денатурация белков микроорганизмов</i>	<i>Почва теплиц и парников</i>
<i>Хлорная известь (3-5%-й раствор)</i>	<i>Действие активного хлора</i>	<i>Почва теплиц и парников</i>
<i>Механические</i>		
<i>Фильтрация через бактериальные фильтры</i>	<i>Величина пор</i>	<i>Сыворотка крови, лекарственные препараты, объекты, пораженные вирусами</i>

*Подготовка сред к стерилизации.* В процессе стерилизации теряется 3-5% жидкости в результате испарения, поэтому в приготовляемые среды необходимо добавлять сверх объема 5% дистиллированной воды. Среды стерилизуют в пробирках, колбах, заполняя их не более чем наполовину, чтобы предотвратить смачивание пробок. Пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, нельзя обертывать фольгой, целлофаном, не пропускающими пар в сосуд, среда не нагреется до нужной температуры и не простерилизуется. Стекланные, резиновые, корковые пробки завертывают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют отдельно. Замену ими ватных пробок проводят над пламенем спиртовки.

*Мытье новой лабораторной посуды.* Новую посуду, которая не была в употреблении, моют мыльной теплой водой. Воду наливают в таз и растворяют в ней хозяйственное мыло или стиральный порошок до образования небольшого количества пены. В эту воду погружают посуду, ставят на слабый огонь и доводят до кипения. После закипания посуду вынимают, охлаждают и ополаскивают чистой водой. Чтобы нейтрализовать избыток щелочи, посуду погружают в теплый 1-2%-й раствор соляной кислоты и кипятят 10 мин, ополаскивают водопроводной водой, а затем дистиллированной.

*Мытье посуды, бывшей в употреблении.* Посуду с посевами микроорганизмов перед мытьем заливают теплой водой и кипятят на медленном огне 40 мин, чтобы убить микроорганизмы. Затем посуду вынимают, а жидкость выливают в канализацию. Не очень загрязненную посуду затем моют горячей водой с мылом и тщательно прополаскивают сначала проточной водопроводной водой, затем дистиллированной.

Более грязную посуду со следами агара, желатина, молока или другой питательной среды заливают на сутки 2-5%-м раствором едкого натрия или калия. После этого прополаскивают и моют ершом и щеткой, прополаскивают повторно проточной водой, затем дистиллированной.

Если посуда сильно загрязнена, со следами жира, ее обрабатывают хромовой смесью. Она является сильным окислителем и хорошо разрушает остатки органических веществ. Хромовой смесью, подогретой до 45-50С°, заливают посуду на 30-40 мин. Посуду после обработки хромовой смесью тщательно промывают проточной, затем дистиллированной водой.

*Мытье градуированных пипеток, бывших в употреблении.* Каждую пипетку внутри хорошо прочищают маленьким ершиком с длинной ручкой или тонкой упругой проволокой, на конец которой плотно накручивают кусок ваты или марли, и опускают в раствор мыльной воды, пищевой соды или стирального порошка. Закупорившийся канал пипетки прочищают иглой. Пипетки кладут в таз, заливают мыльным раствором и ставят на слабый огонь. Кипятят на слабом огне 20-30 мин, вынимают, ополаскивают проточной водой, потом дистиллированной.

*Мытье предметных и покровных стекол.* Стекла должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными, чтобы капля воды, которую наносят на их поверхность, хорошо растекалась, мыть стекла рекомендуется в резиновых перчатках.

Бывшие в употреблении стекла на 2 часа опускают в хромовую смесь, а потом тщательно промывают сначала проточной, а затем дистиллированной водой.

Можно промыть стекла кипячением в течение 40 мин в растворе соды или щелочи (едкого натрия или калия).

Чистые стекла раскладывают в один ряд на фильтровальную бумагу для высушивания. Хранят чистые стекла в чистой закрытой посуде в сухом виде или в смеси спирта с эфиром 1:1.

*Сушка и хранение чистой лабораторной посуды.* Вымытую посуду не вытирают, а дают воде стечь и размещают пробирки на специальной доске с кольшками, а чашки - перевернув вверх дном на чистом столе.

Сухую чистую посуду хранят в местах, надежно защищенных от пыли.

*Подготовка посуды к стерилизации.* Сосуды (колбы, пробирки), предназначенные для розлива питательных сред, закрывают ватными пробками, а горлышки сверху обвязывают бумажными колпачками. Пробки предохраняют среду от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе. Они не должны быть слишком плотными, чтобы не затруднять снабжение культур воздухом. Для приготовления пробок кусок ваты, взятый вдоль волокна, слегка увлажняют, загибают внутрь оба края и скатывают валиком по диаметру колбы



или пробирки. Чтобы придать пробке прочность, её прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Пробка для пробирки должна иметь длину 4 см. Она должна входить в колбу или пробирку на 1,5-2 см. Пробку обортывают кусочком марли в 1 слой и край марли снаружи над пробкой связывают нитками. Перед этим особенно тщательно закручивают между пальцами рук ту часть пробки, которая входит в пробирку или колбу. Качество пробки проверяют так: берут за широкую часть пробки, вставленную в пробирку, и легко трясут её. Пробка под тяжестью пробирки не должна выниматься. Закрытые пробками пробирки завертывают в бумажные пакеты по 10-15 шт. и стерилизуют.

*Чистые чашки Петри* перед стерилизацией заворачивают в оберточную бумагу по 2-3 шт. Бумагу режут на квадраты, сторона которых приблизительно равна трем диаметрам чашки. Чашки Петри кладут на середину листа, загибают его с двух противоположных сторон кверху так, чтобы края налегали друг на друга. Оставшиеся два конца бумаги завертывают вниз.

В верхние концы пипеток вставляют ватные тампоны, так, чтобы кусочек ваты был достаточно плотным и хорошо держался наверху пипетки. Торчащие из пипеток волокна ваты сжигают в пламени горячей спиртовки. Тампон позволяет избежать попадания микроорганизмов в резиновые шланги или в рот при взятии субстрата для анализа. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4-5 см, длиной 50-70 см. Бумагу на пипетку наматывают по спирали, начиная с оттянутого конца и заканчивая у конца с ватным тампоном. Завернутые пипетки перед стерилизацией упаковывают в оберточную бумагу по 10-15 шт. вместе или укладывают в специальные металлические или картонные пеналы. На бумаге пишут объем завернутых пипеток. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец, где находится тампон.

*Шпатели* – обязательно упаковываются по отдельности, а затем их, как и пипетки, оборачивают в общий сверток. Каждый шпатель упаковывается в тонкую бумагу, начиная с треугольного конца. Он кладется на прямоугольный лист, равный по длине двум, а по ширине – одной длине шпателя, на середину, по диагонали. Завертывают косячком верхнюю, затем нижнюю часть шпателя и по диагонали.

Подготовленную посуду стерилизуют сухим жаром.

## Самостоятельная работа

1. Изучить состав естественных, искусственных и синтетических питательных сред, свойства агар-агара, желатины.
2. Научиться готовить к стерилизации посуду (чашки Петри, пробирки, пипетки, шпатели), завернув её в бумагу.
3. Научиться готовить пробки на пробкоделочной машине и вручную для пробирок и колб.

## Задание на дом

1. Изучить влияние окружающей среды на микроорганизмы (Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. - Микробиология, 1978).
2. Выучить правила приготовления питательных сред и подготовки посуды к стерилизации. Методы стерилизации.
3. Заполнить табл. 5 по образцу, определив, к какому типу перечисленные среды относятся.
4. Заполнить табл. 6, определив метод стерилизации.

**Таблица 5. Описание сред по образцу**

Состав сред	Индикаторная	Плотная	Жидкая	Сыпучая	Естественная	Искусственная	Синтетическая	Элективная
1. Мясо	+				+			
2. Мясо-пептонный агар (2%)								
3. Среды Гисса с сахарами (МПА + 0,5% агара и индикатор)								
4. Молоко								
5. Крахмало-аммиачный агар (2%) для актино-мицетов. Состав: сульфат аммония – 1г, $K_2HPO_4$ – 1г, NaCl – 1г, мел – 3г, крахмал – 10г, вода дист. – 1л, pH – 7,2								
6. Среда Чапека для грибов с (2% агара), подкисленная соляной кислотой до pH=5,0. Состав: глюкоза – 30 г, $K_2HPO_4$ – 1г, $MgSO_4$ – 0,5г, KCl – 0,5г, $FeSO_4$ – 0,01 г, $NaNO_3$ – 3г								
7. Среда Эндо. Состав: МПА +2% агара, лактозы – 10 г, сульфит, фуксин(индикатор)								
8. Сенной отвар для сенной палочки. Сено заливают водой, добавляют щепотку мела, кипятят 15 мин, закрывают стерильной пробкой и ставят в термостат на 2 суток								
9. Лист растений								
10. Картофельные ломтики толщиной 2 см, натертые мелом, ставят в сушильный шкаф при 100°C на 10 мин и в термостат на 2 суток								
11. Мясо-пептонный бульон								
12. Пивное сусло с 6% сахара								
13. Почвенный экстракт (1:10)								
14. Яйцо								
15. Навоз								
16. Среда Гетчинсона для аэробных целлюлозо-разрушающих микроорганизмов. Состав: фильтр; вода – 1 л, $CaCl_2$ – 0,1г, NaCl – 0,1г,								

<i>NaNO<sub>3</sub> – 2,5г, FeCl<sub>3</sub> – 0,01г, агар – 20 г</i>								
<b>17. Рыба</b>								
<b>18. Сыворотка крови</b>								
<b>19. Виноградный сок</b>								
<b>20. Почва</b>								
<b>21. Среда Эшби без азота (для азотобактера). Состав: декстрин или манит – 20г, мел – 5г, агар – 2%, вода – 1л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2г, MgSO<sub>4</sub> – 0,2г, NaCl – 0,2г, FeCl<sub>3</sub> – 0,01г, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,1г, FeSO<sub>4</sub> – следы; pH-7,0</b>								
<b>22. Хлеб</b>								
<b>23. Яблоко</b>								
<b>24. Корешки растений</b>								
<b>25. Среда Виноградского для анаэробных азот- фиксаторов, г/л воды: дрожжевой экстракт – следы, глюкоза – 20г, MgSO<sub>4</sub> – 0,5г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1г, NaCl – следы, MgSO<sub>4</sub> – следы FeSO<sub>4</sub> – следы</b>								

**Таблица 6. Определение метода стерилизации**

<i>Стерилизуемый материал</i>	<i>Автоклавирование</i>	<i>Кокхирование</i>	<i>Сухой пар</i>	<i>Кипячение</i>	<i>Флабмбирование</i>	<i>Химический</i>
1. МПА						
2. КАА						
3. Среды Гисса						
4. Среда Чапека						
5. Среда Эндо						
6. Сенной отвар						
7. Картофельные ломтики						
8. Молоко						
9. Среда Гетчинсона						
10. Яйцо сырое						
11. Навоз						
12. Виноградный сок						
13. Почва						
14. Пшено						
15. Бактериологическая петля, пинцет						
16. Стеклянная посуда						
17. Предметные стекла						
18. Воздух помещений						
19. Почва теплиц						
20. Лекарственные препараты						
21. Предметные стекла с мазками						
22. Ланцет, игла						
23. МПБ						
24. Почвенный экстракт						
25. Сыворотка крови						
26. Поверхность лабораторного стола						
27. Вода (малый объем)						
28. Вода для питья						
29. Поверхность рук						

Примечание. Отдельно отметить объекты, для стерилизации которых можно использовать ультрафиолетовый свет, а также бактериальные фильтры.

# ЗАНЯТИЕ 4

## Тема 5. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы

### Оснащение занятия

1. На рабочее место для студентов необходимо подготовить микроскоп; матерчатые и марлевые салфетки, чашку Петри с 3 кубиками (по 1 см) белого хлеба разной влажности (сухой 15%, с влажностью 30 и 60%); культуры микроорганизмов (кишечную палочку, сенную палочку, дрожжи, мукор, сарцину) на питательных средах в пробирках; пробирку со столбиком МПА и со столбиком среды Эндо; 2 пробирки с МПБ; 1 пробирку с 10 мл среды Виноградского для анаэробного фиксатора азота *Clostridium pasteurianum*, стерильную резиновую пробку для закрытия этой пробирки после посева; 3 чашки Петри со средой МПА; 3 чашки Петри со средой Эндо; физраствор в 2 пробирках по 2 мл и 4 по 1 мл; почву (любую) в чашке Петри; бактериологическую петлю; препаровальную иглу; спиртовку; карандаш по стеклу; предметные стекла; кристаллики поваренной соли на часовом стекле; антибиотики в дисках; лук, чеснок, терку для них; шпатели стеклянные; пинцет; ланцет; кулочки или буквы из темной бумаги; ультрафиолетовую лампу; пипетки стерильные на 1 мл.
2. На подгруппу из 15 человек все положенное на 1 рабочее место увеличить в 7 раз.

### Контрольные вопросы

1. Влияние влажности на микроорганизмы.
2. Влияние температуры на микроорганизмы.
3. Отношение микроорганизмов к кислороду.
4. Влияние осмотического давления на микроорганизмы.
5. Влияние антибиотиков и фитонцидов на микроорганизмы.
6. Действие ультрафиолетовых лучей на микроорганизмы.

### Влажность

Микроорганизмы хорошо развиваются в субстрате при влажности 20-30%. Очень чувствительны к недостатку влаги неспорообразующие бактерии. Наиболее устойчивы к высушиванию споры бацилл и плесневых грибов.

*Постановка опыта.* Использовать 3 чашки Петри. В 1 чашку положить 3 ломтика хлеба естественной влажности. На 1-й ломтик, кубик посеять бактериологической петлей бактерию или кокка, на 2-й – бациллы, на 3-й – плесневый гриб.

Во 2-ю чашку положить 3 подсушенных кусочка и также сделать посев бактерий, бацилл и грибов на каждый кусочек отдельно.

В 3-ю чашку положить 3 кубика хлеба, увлажнив их обильно стерильной водой, и снова сделать посев бактерий, бацилл и грибов. Чашки с естественной влажностью и с увлажнением кубиков хлеба до 60% поставить в термостат в закрытом эксикаторе, на дно которого налита вода. Вместо эксикатора можно использовать целлофановый пакет, но с отверстиями для поступления воздуха.

Рост микроорганизмов на влажном хлебе появится через 1-2 дня.

На следующем занятии отметить степень развития каждой группы микроорганизмов на субстрате с разной влажностью. Сделать вывод о большей устойчивости плесневых грибов к недостатку влаги по сравнению с бактериями или кокками.

Результаты записать в тетрадь, привести таблицу интенсивности роста (табл. 7).

**Таблица 7. Интенсивность роста микроорганизмов**

<i>Микроорганизмы</i>	<i>Влажность субстрата</i>		
	<i>контроль, 30%</i>	<i>опыт, 15%</i>	<i>опыт, 60%</i>
<i>Бактерии или кокки</i>			
<i>Бациллы</i>			
<i>Плесневые грибы</i>			

### *Температура*

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на психрофилов – оптимальная температура 5...10°C, мезофилов – 25...37°C и термофилов – 45...60°C. Все микроорганизмы культивируют только при оптимальной температуре.

Низкая температура, как правило, не уничтожает микроорганизмы, а задерживает обменные процессы в их клетках. Высокая температура действует на них губительно. Все клетки микроорганизмов погибают в основном при 50...70°C. Споры микроорганизмов выдерживают нагревание до 80...100°C и более в течение нескольких часов.

Сохраняясь в продуктах, микроорганизмы наносят нам огромный вред. Поэтому установление летальной температуры для микроорганизмов очень важно для практических условий.

### *Постановка опыта*

1. Взять культуру кишечной палочки с косячка со средой Эндо бактериологической петлей и сделать взвесь в пробирке с 2 мл физраствора. Подготовить чашку со средой Эндо. Для этого наружную сторону дна чашки расчертить на 3 сектора карандашом по стеклу и обозначить их 1, 2, 3. Одну петлю из приготовленной взвеси кишечной палочки посеять штрихом в сектор 1. Это и будет контроль – рост культуры без нагревания. Затем взвесь культуры в пробирке с физраствором над спиртовкой довести до кипения, т.е. до появления первых пузырьков и сделать посев штрихом в сектор 2. Эту же взвесь культуры в пробирке про-

кипятить 5 мин над спиртовкой (в слабом пламени) и сделать посев штрихом в сектор 3.

2. Культуру сенной или картофельной палочки взять из пробирки на МПА, сделать взвесь в физрастворе и затем последовательно провести все операции, что и с культурой кишечной палочки, но посев делать на чашки с МПА в сектора 1, 2, 3.
  3. Чашки Петри перевернуть вниз крышками и поставить в термостат с температурой 37°C для кишечной палочки и 25...30°C – для сенной.
- На следующем занятии результаты записать в тетрадь, оформить табл.8.

**Таблица 8. Влияние температуры на микроорганизмы**

<i>Бактерии</i>	<i>Контроль, без нагревания</i>	<i>Опыт, время кипячения, мин</i>	
		<i>1</i>	<i>5</i>
<i>Кишечная палочка</i>			
<i>Сенная палочка</i>			

*Примечание. Интенсивность роста микроорганизмов обозначить: (+++) - сильный рост; (++) - средний, (+) - слабый; 0 - роста нет.*

### **Кислород**

По отношению к кислороду микроорганизмы делятся на аэробов и анаэробов. Между ними существуют промежуточные формы, которые могут развиваться как в присутствии, так и в отсутствие кислорода воздуха.

Это факультативные аэробы или анаэробы. Например, некоторые дрожжи в зависимости от наличия или отсутствия кислорода воздуха осуществляют аэробное дыхание или брожение.

Кислород используют все микроорганизмы. Разница состоит в источнике поступления кислорода. Аэробы для окисления органических соединений получают кислород из воздуха, анаэробы же получают кислород и энергию при разложении сложных органических соединений в отсутствие свободного кислорода воздуха. Для них кислород воздуха токсичен или вызывает гибель клеток.

### **Постановка опыта**

Для аэробов необходимо создать условия, обеспечивающие постоянное поступление в среду кислорода воздуха. Их выращивают на поверхности плотных питательных сред или в тонком слое жидкой среды. Можно выращивать аэробы и в высоком слое жидкой среды, но при непрерывной аэрации (метод глубинной культуры). Этот метод используют в производстве для получения биомассы микроорганизмов или их метаболитов.

Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на качалках, обеспечивающих вращение колб или пробирок с культурами со скоростью 100-200 оборотов в минуту.

Продувание среды кислородом не рекомендуется, так как чрезмерное насыщение среды кислородом (до 40 мг/л) ведет к угнетению роста микроорганизмов.

Условием для выращивания анаэробов является отсутствие кислорода воздуха, поэтому его нужно удалить. Наиболее эффективный способ – выращивание в высоком слое среды. Среду для анаэробов берут свежеприготовленную, чтобы в ней не успел раствориться кислород, и вносят посевной материал на дно. Если среда простерилизована давно, её нужно прокипятить перед употреблением и быстро охладить для удаления кислорода воздуха. Можно поверхность среды для анаэробов залить слоем вазелинового масла или жидким водным агаром и закрыть стерильной резиновой или притертой стеклянной пробкой.

Выращивают анаэробы и в толще агаризованной среды. Культуру анаэроба следует внести в расплавленную и остуженную до 40°C агаризованную среду в пробирке, тщательно размешать и набрать в стерильную длинную стеклянную трубку, один конец которой закрыт стерильной ватой, а другой необходимо залить парафином после посева культуры.

Можно выращивать анаэробы и в специальном лабораторном приборе – анаэростате, из которого отсасывается воздух.

#### *Постановка опыта*

1. В столбик с МПА провести посев уколом по центру среды до дна пробирки культуры сенной или картофельной палочки. Для этого пробирку держат вверх дном над спиртовкой, вынимают пробку и стерильной петлей с захваченным в ней из другой пробирки посевным материалом, осторожно делают укол. Выращивать при температуре 25°C.
2. В столбик с агаром Эндо таким же образом провести посев кишечной палочки и выращивать при 37°C.
3. На следующем занятии по характеру роста микроорганизмов (гвоздик шляпкой вверх – аэроб, гвоздик шляпкой вниз – анаэроб, по всему штриху – факультативный анаэроб) нужно определить их отношение к кислороду.
4. В одну пробирку с МПБ провести посев сенной палочки, в другую – кишечной. Выращивать в термостате соответственно при 25°C и 37°C.
5. На следующем занятии по характеру роста микроорганизмов на бульоне определить их отношение к кислороду (рост пленкой на поверхности – аэроб, равномерное помутнение или пристеночные хлопья – факультативный анаэроб, осадок на дне пробирки – анаэроб).
6. Для выращивания анаэробных азотфиксирующих микроорганизмов (*Clostridium pasteurianum*) в пробирку, содержащую 100 мг мела и высокий слой (10 мл) свежеприготовленной жидкой среды Винорадского, внести небольшое количество почвы. Закрывать пробирку стерильной резиновой пробкой и поставить в термостат с температурой 25...30°C. Через несколько дней поверхность жидкости покроется пленкой аэробов,



выросших за счет остаточного кислорода в пробирке, а на дне начнется масляно-кислое брожение с обильным газообразованием.

7. На следующем занятии записать характер газообразования и сделать мазок-препарат из осадка. Для распознавания анаэробных клостридиев провести окраску капли жидкости йодом. Клетки масляно-кислых клостридиев содержат гранулезу, которая с йодом дает фиолетовое окрашивание.

Результаты записать в тетрадь в виде таблицы (табл. 9).

**Таблица 9. Отношение микроорганизмов к кислороду**

<i>Микроорганизмы</i>	<i>Характер роста</i>	<i>Отношение к кислороду</i>
<i>1 – й опыт</i>		
<i>Кишечная палочка</i>		
<i>Сенная палочка</i>		
<i>2 – й опыт , в жидкой среде</i>		
<i>Кишечная палочка</i>		
<i>Сенная палочка</i>		
<i>3 – й опыт , в жидкой среде для клостридиев</i>		
<i>Анаэробный фиксатор азота</i>		

### **Осмотическое давление**

Между микроорганизмами и окружающей средой совершается непрерывный обмен веществ. Интенсивность его определяется комплексом факторов, в том числе и концентрацией раствора. Клетка функционирует нормально, если находится в состоянии тургора, т.е. когда концентрация раствора в клетке и вне её равны. При высокой концентрации раствора вне клетки наступает её плазмолиз, т.е. обезвоживание и гибель.

#### **Постановка опыта**

1. Пекарские дрожжи развести в 1 мл стерильной дистиллированной воды до очень слабой суспензии.
2. Каплю суспензии поместить на предметное стекло и внести в неё несколько кристалликов поваренной соли или сахара. Закрыть препарат покровным стеклом.
3. Дать препарату постоять 5 мин.
4. Микроскопировать с увеличением 15×60 или капнуть капельку кедрового масла на покровное стекло и смотреть с иммерсией.
5. В клетках дрожжей отмечается явление плазмолиза, т.е. протоплазма отходит от оболочки и сжимается.

### **Антибиотики и фитонциды**

Слово «антибиотик» происходит от двух слов: «анти» – против, «биос» – жизнь. В отличие от других химических ядов (спирты, органические кислоты, соли тяжелых металлов) антибиотики обладают избирательным действием на микроорганизмы.

Антибиотическим действием обладают и летучие вещества, выделяемые растениями. Они называются фитонцидами.

#### *Постановка опыта*

1. На поверхность застывшего МПА в чашке Петри нанести петлей широкий штрих картофельной палочки (*Mesentericus*). Перпендикулярно к ней параллельными штрихами посеять грибовидную палочку (*Bacillus mycoides*) и желтую сарцину (*Sarcina flavus*). Затем чашки с посевами поставить в термостат с температурой 25...30°C.

На следующем занятии отметить результаты опыта.

Картофельная палочка выделяет антибиотики и угнетает рост грибовидной палочки и сарцины. Поэтому в непосредственной близости от штриха картофельной палочки роста этих культур не будет, на некотором расстоянии слабый рост, а дальше от штриха – нормальный.

2. Приготовить суспензию кишечной палочки в 1 мл физраствора. Нанести капельку суспензии в центр чашки Петри со средой Эндо и растереть шпателем по всей поверхности среды. Можно сделать посев густыми штрихами по всей поверхности среды в двух взаимно перпендикулярных направлениях, взяв материал из суспензии бактериологической петлей.

В разных местах на поверхности засеянной среды положить 3 бумажных диска, пропитанных разными антибиотиками, мелко свеженатёртые лук и чеснок. С обратной стороны чашки (на дне) сделать пометки секторов: 1, 2, 3, 4, 5 и записать, что в них внесено. Например: сектор 1 – мономицин, сектор 2 – левомицетин, сектор 3 – эритромицин, сектор 4 – лук, сектор 5 – чеснок.

Чашки перевернуть вверх дном и поставить в термостат при 37°C. На следующем занятии провести учет посевов. Если антибиотики и фитонциды подавляют взятую культуру микроорганизмов, то вокруг диска образуется светлая зона задержки роста.

Приготовить суспензию сенной палочки в 1 мл физраствора и нанести капельку её в центр чашки Петри со средой МПА. Прodelать те же операции, что и с кишечной палочкой в пункте 2. Выращивать при температуре 25...30°.

На следующем занятии результаты записать в тетрадь в виде таблицы (табл. 10).

**Таблица 10. Влияние антибиотиков и фитонцидов на микроорганизмы**

<i>Бактерии</i>	<i>Зона задержки роста</i>				
	<i>мономицин</i>	<i>левомицетин</i>	<i>эритромицин</i>	<i>лук</i>	<i>чеснок</i>
<i>Кишечная палочка</i>					
<i>Сенная палочка</i>					

Отметить избирательность действия антибиотиков и фитонцидов на микроорганизмы.

#### *Ультрафиолетовые лучи*

Свет обладает неодинаковым действием на микроорганизмы. Рассеянный свет не оказывает заметного влияния на большинство бактерий. Сильным бак-

терицидным (губительным) действием обладают ультрафиолетовые лучи. Поэтому их используют для дезинфекции воздуха в лабораториях, животноводческих помещениях, операционных и других закрытых помещениях, где необходимо уничтожить микроорганизмы.

#### *Постановка опыта*

1. Петлю культуры кишечной палочки, взятую из пробирки с косячка на среде Эндо, перенести в пробирку с 1 мл физраствора.
2. Приготовить в пробирке с физраствором густую взвесь кишечной палочки, тщательно размешав взятую культуру.
3. Из этой взвеси сделать посев густым штрихом бактериологической петлей на поверхность среды Эндо в чашке Петри или 1 каплю взвеси нанести на поверхность среды в центр чашки со средой Эндо и растереть по всей поверхности шпателем.
4. На засеянную поверхность нанести пинцетом стерильные кусочки темной бумаги, не пропускающей свет.
5. Чашки открыть и поставить под лампу ультрафиолетового света на 10 мин на расстоянии 20 см.
6. Стерильным пинцетом убрать кусочек темной бумаги.
7. Чашку перевернуть вверх дном и поставить в термостат с температурой 37°C.

Для сопоставления результатов необходимо аналогичный опыт поставить со спорообразующей культурой бактерий – сенной или картофельной палочкой, посеяв их на среде МПА.

На следующем занятии провести учет и результаты записать в виде таблицы (табл.11).

**Таблица 11. Влияние ультрафиолетовых лучей на микроорганизмы**

<i>Бактерии</i>	<i>Контроль, рост под кусочком темной бумаги</i>	<i>Опыт, рост в чашке после действия ультрафиолетового света</i>
<i>Сенная палочка</i>		
<i>Кишечная палочка</i>		

*Примечание. Интенсивность роста обозначить: (+++)- сильный рост; (++)- средний; (+) слабы; 0 - роста нет.*

Сопоставить устойчивость к факторам среды спорообразующих и неспорообразующих бактерий.

#### **Самостоятельная работа**

1. Ознакомиться с влиянием факторов среды на микроорганизмы.
2. Заложить опыты по влиянию влажности, температуры, аэрации, осмотического давления, антибиотиков, фитонцидов и ультрафиолетового света на микроорганизмы.

#### **Задание на дом.**

Изучить действие экологических факторов на микроорганизмы.

# **ЗАНЯТИЕ 5**

## **Тема 6. Специфика отношения к условиям внешней среды разных групп микроорганизмов**

### **Оснащение занятия**

Микроскоп, предметные стекла, красители, бумажки фильтровальные, салфетки, спиртовки, бактериологические петли, водопроводная и дистиллированная вода в колбах по 250 мл, измерительные линейки, маркеры, бактерицидная лампа.

### **Контрольные вопросы**

1. Чем отличается влияние влажности на бактерии, грибы и актиномицеты?
2. Источник кислорода для аэробов и анаэробов.
3. Чем отличается действие УФ - света на бактерии и бациллы
4. Какие микроорганизмы : бактерии или бациллы - устойчивее к высоким температурам?
5. Учет влияния факторов внешней среды на микроорганизмы: влажности, температуры, кислорода, осмотического давления, антибиотиков и фитонцидов, ультрафиолетовых лучей.

### **Самостоятельная работа**

1. В каждом из опытов, поставленных на прошлом занятии, провести учёт и сделать заключение об отношении разных таксономических групп микроорганизмов к одному и тому же экологическому фактору.
2. Установить роль спор в устойчивости к неблагоприятным факторам среды.
3. Провести микроскопию клеток.

### **Задание на дом**

Изучить разную устойчивость спор бацилл, актиномицетов и грибов в стрессовых ситуациях.

# **ЗАНЯТИЕ 6**

## **Тема 7. Круговорот серы в природе**

Круговорот серы изучают при получении культуры пурпурных бактерий. Они относятся к фотосинтезирующим серобактериям и на свету в анаэробных условиях осуществляют синтез органического вещества путём восстановления углекислоты водородом сероводорода. В состав их пигментов входит бактериохлорофилл и каротиноиды.

### **Оснащение занятия**

Стеклянные цилиндры на 10 мл – 10 шт., пучки сена по 5 г – 10 шт., камешки массой 10 г – 10 шт., марля.

### **Контрольные вопросы**

1. Окислительный этап круговорота серы.
2. Косвенный и прямой путь окисления серы и участвующие в них микроорганизмы.
3. Восстановительный этап круговорота серы.

### **Постановка опыта**

1. На дно высокого стеклянного цилиндра положить пучок сена и прижать его камешком ко дну.
2. Залить сосуд водой.
3. Завязать сосуд сверху марлей и поставить на свет на окно.
4. Через 1,5 – 2 месяца провести учет и микроскопию из красных пятен на стенках сосудов. В анаэробных условиях в сосуде сено разлагается анаэробными гнилостными бактериями с выделением сероводорода, который окисляется пурпурными бактериями в процессе фотосинтеза. Микроскопию пурпурных бактерий можно сделать в живом и фиксированном виде. В поле зрения видны извитые формы серобактерий: вибрионы и спириллы. Они принимают участие в круговороте серы в природе.

### **Самостоятельная работа**

Провести опыт по схеме, приведённой выше, для изучения восстановительного этапа окисления серы от сероводорода до неорганической серы.

### **Задание на дом**

1. Изучить круговорот серы и все участвующие в нём микроорганизмы записать в лабораторную тетрадь.
2. Составить схему круговорота серы.
3. Отметить, в окислительном или восстановительном этапе круговорота серы участвуют фотосинтезирующие бактерии.

## **ЗАНЯТИЕ 7. Коллоквиум**

1. Микробиологическая лаборатория и правила работы в ней.
2. Микроскоп и техника микроскопии.
3. Бактериологическая техника.
4. Питательные среды, способы стерилизации.
5. Влияние факторов среды на микроорганизмы.
6. Круговорот серы.

# БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Черемисинов Н.А. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Высш. шк., 1968.
2. Федоров М.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Сельхозгиз, 1957.
3. Разумовская З.Г. и др. Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. – Л.: Изд - во Ленингр. ун – та, 1960.
4. Ежов Г.И. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии. – М.: Высш. шк., 1976.
5. Теппер Е.З. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1979.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. - М.: Изд - во Моск. ун – та, 1976.

# СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>3</b>
<b>ЗАНЯТИЕ 1 .....</b>	<b>7</b>
<b>Тема 1. Микробиологическая лаборатория .....</b>	<b>7</b>
Оснащение занятия .....	7
Контрольные вопросы .....	7
Правила работы в микробиологической лаборатории .....	7
Оборудование микробиологической лаборатории .....	9
Оборудование рабочего стола .....	10
<b>Тема 2. Микроскоп и техника микроскопии .....</b>	<b>9</b>
Контрольные вопросы .....	9
Устройство микроскопа .....	9
Основные правила работы с микроскопом.....	12
Техника работы со спиртовкой, бактериологической петлей, пробиркой и чашкой Петри, с культурами микроорганизмов.....	12
Самостоятельная работа .....	14
Задание на дом.....	14
<b>ЗАНЯТИЕ 2 .....</b>	<b>15</b>
<b>Тема 3. Общая бактериологическая техника. ....</b>	<b>15</b>
Оснащение занятия .....	15
Контрольные вопросы .....	15
Правила приготовления мазка-препарата.....	15
Простые методы окраски .....	16
Сложные методы окраски .....	17
Техника окраски по Граму.....	17
Характеристика и окраска спор.....	18
Особенности окраски спор.....	19
Техника окраски спор по Пешкову .....	19
Изучение микроорганизмов в живом состоянии .....	19
Самостоятельная работа .....	21
Задание на дом.....	21
<b>ЗАНЯТИЕ 3 .....</b>	<b>24</b>
<b>Тема 4. Питательные среды, стерилизация .....</b>	<b>24</b>
Оснащение занятия .....	24
Контрольные вопросы .....	24
Требования, предъявляемые к питательным средам .....	24
Типы питательных сред .....	26
Использование сухих питательных сред.....	27
Понятие о стерилизации.....	28
Методы стерилизации .....	29
Самостоятельная работа .....	33
Задание на дом.....	34
<b>ЗАНЯТИЕ 4 .....</b>	<b>37</b>
<b>Тема 5. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы.....</b>	<b>37</b>
Оснащение занятия .....	37
Контрольные вопросы .....	37
Влажность.....	37
Температура .....	38
Кислород.....	39
Осмотическое давление .....	
Антибиотики и фитонциды.....	41
Ультрафиолетовые лучи.....	42
Самостоятельная работа .....	43



Задание на дом .....	43
<b>ЗАНЯТИЕ 5 .....</b>	<b>44</b>
<b>Тема 6. Специфика отношения к условиям внешней среды разных групп</b>	
<b>микроорганизмов .....</b>	<b>44</b>
Оснащение занятия .....	44
Контрольные вопросы .....	44
Самостоятельная работа .....	44
Задание на дом.....	44
<b>Тема 7. Круговорот серы в природе.....</b>	<b>45</b>
Оснащение занятия .....	45
Контрольные вопросы .....	45
Постановка опыта.....	45
Самостоятельная работа .....	45
Задание на дом.....	45
<b>ЗАНЯТИЕ 7.Коллоквиум .....</b>	<b>47</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....</b>	<b>48</b>
<b>СОДЕРЖАНИЕ.....</b>	<b>49</b>

*Составитель Наплекова Надежда Николаевна*

*Общая микробиология*

*Методические указания к лабораторным занятиям*

*Редактор Т.К. Коробкова  
Компьютерная верстка*

*Формат 84 х 108/32  
Подписано к печати  
Объем 3,0 уч. – изд. л.*

*Тираж 300 экз. Изд. № 12. Заказ №*

*Типография*