

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт экологической и пищевой биотехнологии

Особенности работы в учебной микробиологической лаборатории

Учебно-методическое пособие



Новосибирск 2024

УДК 579:061.62(07)
ББК 28.4 с4,я7
О 754

Кафедра Экологии

Составители: канд. биол. наук, доцент *Л.А. Литвина*,
старший преподаватель *В.Г. Горских*,
старший преподаватель *И.Ю. Анфилофьева*

Рецензент канд. биол. наук, доцент *О.Г. Грачева*

Особенности работы в учебной микробиологической лаборатории: учебно-методическое пособие / Новосибирский государственный аграрный университет; Институт экологической и пищевой биотехнологии; составители: Л.А. Литвина, В.Г. Горских, И.Ю. Анфилофьева. – 3-е изд., доп. и исп. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2024. – 95 с.

Освещены основные правила работы и поведения в учебной микробиологической лаборатории, приведены составы и техника приготовления растворов, красителей, питательных сред; описана техника работы с основными приборами лаборатории (термостат, автоклав, сушильный шкаф, анаэробная камера). Приведено сравнение с организацией вирусологической лаборатории с более строгими требованиями к охране сотрудников, лабораторной и окружающей среды от вирусов. В пособии большое внимание уделено вопросам дезинфекции и стерилизации, а также контролю за эффективностью этих мероприятий. Приемы дезинфекции выходят за рамки лаборатории, они широко применяются в жизни и будут полезны выпускникам в будущем.

Учебно-методическое пособие может использоваться на лабораторно-практических занятиях по дисциплинам «Микробиология», «Основы микробиологии», «Микробиология с основами вирусологии», «Общая санитарная микробиология», а также для проведения инструктажа по технике безопасности со студентами ИЭПБ, обучающимися по направлениям подготовки: 06.03.01 и 06.04.01 – Биология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья, 19.03.03 – Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 – Технология продукции и организация общественного питания, 35.03.07 – Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции и 36.03.02 – Зоотехния.

Утверждено и рекомендовано к изданию учебно-методическим советом Института экологической и пищевой биотехнологии Новосибирского государственного аграрного университета (протокол №5 от 17 июня 2024 г.).

ВВЕДЕНИЕ

В процессе работы в учебной микробиологической лаборатории студенты овладевают или знакомятся с целым рядом методов исследования представителей микромира, а именно:

- 1) техникой и методами микроскопирования;
- 2) изучением морфологии представителей различных групп микроорганизмов;
- 3) подходами к выделению чистых культур и их идентификации;
- 4) определением влияния биотических и абиотических факторов среды на рост микроорганизмов и образование ими разнообразных продуктов жизнедеятельности;
- 5) с некоторыми методами генетических исследований бактерий;
- 6) методами определения микробиоты молока и кисломолочных продуктов, мяса, воды, воздуха, почвы.

Для проведения занятий преподавателю, лаборантам необходимо иметь полное представление о микробиологических лабораториях в целом, чему и посвящено данное пособие. Эти сведения могут быть ценны и для студентов, проявляющих интерес к микробиологии и занимающихся научными исследованиями.

Работа со студентами в лаборатории микробиологии начинается с формы одежды (халат и шапочка) и проведения инструктажа по технике безопасности. Студенты расписываются в специальном журнале о том, что ознакомлены с техникой безопасности. Рядом расписывается преподаватель, проводивший инструктаж.

Соблюдая перечисленные в учебно-методическом пособии правила, сотрудники и студенты обеспечат себе нормальную безопасную работу, стерильность проводимых посевов и предупредят возникновение каких-либо осложнений, возможных при работе с микроорганизмами.

1. ВИДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

По своему назначению микробиологические лаборатории могут быть:

1. **Диагностические** – проводят исследования с целью обнаружения и идентификации возбудителей заболеваний животных (**ветеринарные**) и человека (**медицинские**). Они находятся в медицинских и ветеринарных учреждениях.

2. **Контрольные (производственные)** – лаборатории, осуществляющие ведомственный лабораторный контроль выпускаемой продукции на её соответствие нормативной документации по санитарно-показательным микроорганизмам (на мясокомбинатах, молочных, хлебных, пивоваренных, дрожжевых заводах).

3. **Научно-исследовательские** – разрабатывают теоретические вопросы, связанные с изучением свойств микроорганизмов и защиты от патогенных микроорганизмов.

4. **Учебные** – в них студенты обычно знакомятся с сапрофитными микроорганизмами, т.е. не патогенными для человека. Но следует иметь в виду, что при исследовании различных материалов (вода, молоко, мясо, навоз, почва и т.д.) на питательных средах могут быть выявлены патогенные виды микроорганизмов. В связи с этим основные правила работы в микробиологическом практикуме университета являются общими с правилами других микробиологических лабораторий.

Ветеринарные микробиологические лаборатории – это учреждения государственной ветеринарной службы, деятельность которых направлена на обеспечение благополучия в животноводстве, предупреждение и ликвидацию болезней и гибели животных, а также на охрану населения от болезней, общих для животных и человека. По назначению ветеринарные лаборатории бывают районные, межрайонные (зональные), областные (краевые) и республиканские.

*Основные задачи ветеринарных микробиологических
лабораторий:*

- 1) Установление точного диагноза болезней с.-х. животных, включая птиц, пушных зверей, рыб и пчел.
- 2) Проведение экспертизы мяса, молока.
- 3) Проведение экспертизы пищевых продуктов животного и растительного происхождения.
- 4) Производство некоторых биостимуляторов, антибиотиков и др.
- 5) Выполнение научных работ.

Материалом для лабораторных исследований в ветеринарной лаборатории служат кровь, моча, мокрота, фекалии, содержимое абсцессов (гноя), полученные при жизни животного; фрагменты паренхиматозных органов или других тканей после гибели животного; пробы объектов окружающей среды (вода, воздух, почва, корма, растения, смывы с предметов ухода).

Медицинские микробиологические лаборатории. В медицинских микробиологических лабораториях исследуют различные патогенные для человека микроорганизмы – ПБА (Патогенные Биологические Агенты) – бактерии, вирусы, грибы, простейшие, микробные токсины. Микробиологические исследования представляют собой идентификацию микроорганизма в образце биологического материала, а также выяснение его биохимических свойств, токсической и антигенной опасности, и восприимчивости к антибиотикам.

По группам риска микробиологические лаборатории делятся на:

- **Особого режима.** Это максимально изолированные объекты, для которых характерен высокий индивидуальный и общественный риск.
- **Режимные.** Это изолированные объекты с высоким индивидуальным, но низким общественным риском.
- **Базовые.** Основные лаборатории, в которых существует умеренный индивидуальный и ограниченный общественный риск. Базовые лаборатории с низким уровнем опасности.

Безопасность работы с микроорганизмами I-II и III-IV групп патогенности и гельминтами определяется нормативными документами.

Работа в учебной микробиологической лаборатории отличается от работы в других микробиологических лабораториях тем, что **непосредственного контакта с патологическим материалом здесь нет**. Но при исследовании даже сапрофитных микроорганизмов возможно выделение патогенных, поэтому разработаны общие требования, которые необходимо соблюдать во всех лабораториях микробиологии.

2. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ

В лаборатории микробиологии материал исследуют **бактериологическими, серологическими, гистологическими, биохимическими, микологическими и токсикологическими** методами, для чего должны быть созданы необходимые условия (специально отведенные помещения, оборудование, микроклимат и др.). Когда речь идет о медицинской или ветеринарной микробиологической лаборатории, то необходимо, чтобы она занимала отдельное здание, расположенное вдали от проезжих дорог. В ней должны быть приемное отделение, патологоанатомический, бактериологический, серологический, биохимический и вирусологический отделы, а также специальные помещения для термостатов, мытья посуды, автоклава. В комнате для мытья посуды должны находиться столы, раковины к которым подведено горячее и холодное водоснабжение, газовая или электрическая плита, стеллажи для вымытой посуды, вытяжной шкаф, эмалированные ванны, тазы и другие емкости, раствор кислоты в стеклянных сосудах для обеззараживания пипеток, предметных стекол и другой посуды.



*ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором
UVT-B-ar (настольный бокс)*

Отдельное помещение отводят под бактериологическую кухню (средоварочная), где готовят питательные среды для культивирования микроорганизмов, подготавливают посуду к стерилизации. Здесь же в шкафах хранят стерильную посуду и хорошо упакованные химические реактивы, компоненты питательных сред.

Лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, белых крыс, кроликов и др.) размещают в **виварии**. Здесь осуществляется **биологическая проба – заражение лабораторных животных**. Как правило, в виварии содержат также здоровых баранов-доноров, кровь которых используют для реакции свя-

зывания комплемента (РСК) и приготовления питательных сред. Зараженных лабораторных животных содержат в изолированном помещении.

Кроме того, в здании микробиологической лаборатории есть комнаты для специалистов, обслуживающего персонала, кабинет заведующего, библиотека, весовая, раздевалка, склад и др.

2.1 Требования к учебной микробиологической лаборатории

Учебная микробиологическая лаборатория, как правило, не располагается в отдельном здании, поскольку работа не проводится с патогенными микроорганизмами, но целый ряд требований к лаборатории все-таки остается. В лаборатории должны быть горячая и холодная вода, канализация, педальные ведра для мусора, которые ежедневно освобождают, моют и дезинфицируют,



*Стерильный перчаточный бокс
с фронтальным окном*

полотенца, мыло и дезинфицирующие растворы. В комнатах должно находиться только самое необходимое оборудование: столы, шкаф для хранения мелкой аппаратуры, красок, реактивов, посуды, инструментов и т.п., холодильник для исследуемого материала и коллекционных культур. Столы для микроскопии обычно устанавливают перед окнами. Они должны быть устойчивыми, удобными, высотой 80 см, с закраиной, не дающей

возможности оборудованию упасть со стола. Поверхность столов покрывают пластиком или линолеумом, стеклом или белой специальной краской. На столе размещают микроскоп, а также необходимые предметы для работы.



Термостат

Для выполнения работы в асептических условиях оборудуют специальные изолированные помещения – **боксы** (англ. *box* – коробка), состоящие из соб-



Сушильный шкаф

ственно бокса и предбоксника. Используют также настольные боксы, предметы и воздух в которых обеззараживают лампами УФИ, и ламинарные шкафы, где, кроме этого, воздух проходит через систему фильтрации и затем всасывается через рабочую поверхность.

Чтобы поддерживать надлежащую чистоту, пол в комнатах покрывают линолеумом или кафельной плиткой. Стены и потолки, как правило, гладкие (без карнизов и лепных украшений), с закругленными углами, окрашенные в светлые тона масляной краской. Потолки можно белить известью. Желательно стены облицевать пластиком или плиткой от пола до потолка.

2.2 Оборудование учебной микробиологической лаборатории

Из нескольких методов исследований, проводимых в микробиологических лабораториях (бактериологические, серологические, метод полимеразной цепной реакции – ПЦР для обнаружения ДНК или РНК возбудителя инфекционного заболевания), в условиях учебной микробиологической лаборатории используют в основном **бактериологический метод**. В руках микробиолога находится основное "оборудование" – **бактериологическая петля, с помощью которой производят посевы, готовят препара-**



Стерилизатор паровой

ты для микроскопии. Бактериологический метод включает микроскопию, выделение и изучение культурально-биохимических свойств чистых культур, определение вида выделенных микроорганизмов, отношение их к различным факторам внешней среды. В качестве исследуемого материала может быть взято молоко, кисломолочные продукты, мясо, почва, вода, воздух.

Для работы в лаборатории необходимы следующие приборы и аппараты: биологические иммерсионные микроскопы с дополнительными приспособлениями (осветитель, фазово-контрастное устройство, темнопольный конденсатор и др.), люминесцентные микроскопы, термостаты, ламинарные боксы, аппаратура для стерилизации, рН-метры, аппараты для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифуги, технические и аналитические весы, аппаратура для фильтрования (фильтр Зейтца и др.), водяные бани, холодильники, аппарат для изготовления ватно-марлевых пробок, набор инструментов (бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др.), лабораторная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри, матрацы, флаконы, ампулы, дозаторы, пастеровские и градуированные пипетки) и др.



Весы аналитические



Анаэробостат

вальная бумага и др. Каждое рабочее место снабжено газовой горелкой или спиртовкой, емкостью с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими препаратами и другими лабораторными материалами. В крупных лабораториях имеются термостатные комнаты для мас-

ты и др.), лабораторная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри, матрацы, флаконы, ампулы, дозаторы, пастеровские и градуированные пипетки) и др.

В лаборатории выделено специальное место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы готовых красителей, спирт, кислоты, фильтро-



Средоварка

сового выращивания микроорганизмов, постановки серологических реакций.

Для выращивания, хранения культур микроорганизмов, стерилизации лабораторной посуды и других целей предназначена следующая аппаратура:

1. Термостат. Аппарат, в котором поддерживается постоянная температура. Оптимальная температура для размножения многих микроорганизмов составляет 37 °С. Термостаты бывают воздушными и водяными.

2. Микроанаэроустат. Аппарат для выращивания микроорганизмов в анаэробных условиях, используется для создания вакуума с дозированным содержанием кислорода. Прибор представляет собой герметически закрытый сосуд, снабженный манометром, в который помещают посе́вы и откачивают воздух. Микроанаэроустат помещают в термостат с нужной температурой.



*Весы технические
лабораторные ВЛТЭ*

3. Холодильники. Используют в микробиологических лабораториях для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, крови, сывороток, вакцин и прочих биологических препаратов при температуре около 4 °С. Для хранения препаратов ниже 0 °С предназначены низкотемпературные холодильники, в которых поддерживается температура -20 °С и ниже, морозилки.



Центрифуга

4. Средоварка для приготовления сред.

5. Центрифуги. Применяют для осаждения микроорганизмов, эритроцитов и других клеток, разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии). В лабораториях используют центрифуги с различными режимами работы.

6. Сушительно-стерилизационный шкаф (печь Пастера). Предназначен для воздушной стерилизации лабораторной посуды и других материалов.

7. Стерилизатор паровой (автоклав). Предназначен для стерилизации паром под давлением. В микробиологических лабораториях используют автоклавы разных моделей (вертикальные, горизонтальные, стационарные, переносные).

8. Ламинарный микробиологический бокс (ламинарный шкаф биологической безопасности). Предназначен для работы с потенциально опасными биологическими агентами (ПБА) и обеспечивает защиту сотрудника и лабораторной среды за счет специальной системы вентиляции. При закрытии передней стенки создается воздушная защита, не дающая воздуху выходить из бокса и проникать в него, а воздух бокса обеззараживается фильтрованием через специальные фильтры. После работы



*Бокс безопасности II класса
БМБ-II-"Ламинар-С."-1,5
NEOTERIC*



*Бокс БАВн-01
-"Ламинар-С" - 1,5*

включаются бактерицидные лампы, обеззараживающие все пространство бокса.

2.3 Особенности организации вирусологической лаборатории

Фактически, при организации и оборудовании вирусологической лаборатории руководствуются теми же принципами и правилами, что и при создании бактериологической лаборатории, только меры безопасности для сотрудников, окружающей среды, а также соблюдение условий стерильности, более строгие.

Все работы проводятся в боксах (Боксы Биологической Безопасности), имеющих определенные классы защиты (I-III), обеспечивающие защиту персонала, всех материалов, среду лаборатории и окружающую среду от контаминации вирусами и посторонними микроорганизмами. Вход в боксы происходит через шлюз, или предбоксник с раздвижными дверями, чтобы исключить движение воздуха.

БББ I класса оборудованы системой отрицательного давления воздуха (преобладание притока над вытяжкой) и системой вентиляции. Предназначены для проведения стандартных микробиологических исследований с микроорганизмами низкого и среднего классов опасности.

БББ II класса оборудованы вертикальной системой ламинированного потока воздуха со встроенными высокоэффективными сухими воздушными фильтрами, обеспечивающими защиту от внешней контаминации материалов, с которыми осуществляются манипуляции в БББ. Предназначены для выполнения микробиологических процедур, требующих 2-го или 3-го УББ (уровня биологической защиты).



*Бокс биологической безопасности
класс III*

БББ III класса представляют собой полностью изолированные газонепроницаемые комнаты, обеспечивающие максимально возможный уровень защиты персонала и окружающей среды. Предназначены для проведения манипуляций, требующих 3-го и 4-го УББ. При работе в БББ используют средства индивидуальной защиты персонала – очки, респираторы, лицевые щитки, перчатки и халат.

Помещение вирусологической лаборатории в обязательном порядке должно быть оборудовано системой эффективной приточно-вытяжной вентиляции, водопроводной системой (ГВС и ХВС), электрифицировано. Помимо этого, желательно наличие централизованной системы сжатого воздуха и вакуума.

Сотрудники вирусологических лабораторий проходят специальную подготовку, особенно если речь идет об особо опасных вирусных инфекциях. Такую подготовку можно пройти на базе ГНЦ Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» (Кольцово, НСО).



Работа в микробиологической лаборатории

В вирусологических лабораториях выращиваются культуры клеток – это клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (*in vitro*), в которых происходит репродукция вирусов.

Первично-трипсинизированные культуры клеток, полученные непосредственно из органов или тканей организма, растущие *in vitro* в один слой. Культуру клеток можно получить практически из любого органа или ткани взрослого, или эмбриона, человека или животного. Однако лучше это удастся сделать из эмбриональных органов, так как клетки эмбрионов обладают более высокой потенцией роста. Чаще всего для этих целей используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных.

Субкультуры, которые получают из первичных клеток, выращенных в матрасах, путем снятия их со стекла раствором версена или трипсина, ресуспендирования в новой питательной среде и пересева на новые матрасы или пробирки; через 2-3 суток формируется необходимый монослой клеток.

Перевиваемые культуры клеток могут размножаться вне организма неопределенно длительное время. Получают перевиваемые культуры из первичных, путем многократного пересева. В лаборатории их поддерживают путем пересевов из одного сосуда в другой с заменой питательной среды. Перевиваемые

культуры клеток получают из здоровых тканей животных, и из опухолевых. У перевиваемых культур гетероплоидный набор хромосом (у первичных клеток он диплоидный).

Используют линии клеток:

- HeLa (из раковой опухоли шейки матки женщины).
- Нер-2 (из карциномы гортани человека).
- KB (из раковой опухоли полости рта).
- ВНК-21 (из почки новорожденного хомячка).
- ППЭС (перевиваемая почка эмбриона свиньи).
- ППТ (перевиваемая почка теленка).
- ППО (перевиваемая почка овцы).
- TR (из слизистой трахеи коровы).
- L (мышинные фибробласты).
- СОЦ (из сердца обезьяны циномольтус) и др.

Диплоидные культуры клеток – это клетки, не обладающие опухолевой активностью, имеют ограниченный срок жизни и выдерживают несколько пассажей, но их можно заморозить (-196°C) и восстановить. Диплоидные клетки получают из различных тканей эмбриона человека (легкие, почки, кожно-мышечная ткань, сердце и др.) и животных (почка эмбриона крупного рогатого скота, свиней, ВНК-21 – почка хомяка и др.).

Суспензионные культуры клеток. Другой подход к культивированию клеток в суспензии – применение микроносителей (сефадекс, силикагель, цитотар и др.); на микроносителях культивируемые клетки формируют монослой. Адаптированы многие линии перевиваемых клеток к размножению в этих условиях (ВНК-21, Нер-2, МДБК и др.). Способ культивирования на микроносителях открывает большие перспективы в клеточной биотехнологии, в получении вакцин и других биологически активных веществ (интерферон, гормоны и т. д.).



Магнитная мешалка

Высокие требования предъявляются к подготовке посуды для культивирования клеток. В лаборатории должно быть отделение для приготовления питательных сред. В нем присутствует полный набор стандартной лабораторной посуды, а также специальные установки для обработки воды.

Вода, принимающая участие в подготовке сред, должна быть дважды подвергнута процедуре дистилляции в специальных стеклянных аппаратах или деионизации в колонках с ионообменными смолами. При необходимости стерилизации растворов для приготовления сред, которые нельзя подвергать автоклавированию, применяют асбестоцементные стерилизующие пластины Зейтца. Процедура фильтрации в данном случае выполняется при давлении 0,5 Атм.



*Гомогенизатор лабораторный
ГЛ-II-300 5000*

Автоклавная, предназначенная для стерилизации посуды, питательных сред, обезвреживания инфекционных материалов. В обязательном порядке устанавливаются два автоклава: один – для чистых материалов, а второй – для инфицированных («убивка»).

Моечная, где происходит очистка приборов, посуды и аппаратуры. Большинство посуды является разовой.

Главное отличие – необходимость обеспечения дополнительных условий безопасности, а также условий, при которых становится возможным:

- ✓ Выращивание тканевых и клеточных культур для последующего заражения их вирусами.
- ✓ Приготовление питательных сред для тканевых культур.
- ✓ Ультрацентрифугирование.
- ✓ Хранение вирусов при низких температурных значениях и т.п.
- ✓ Предохранение культур от контаминации посторонними микроорганизмами.

Для этого в лаборатории должны быть:

✓ Гомогенизатор, предназначенный для измельчения тканей.

✓ Магнитные мешалки (при наличии функции подогрева оборудование способно равномерно подогревать раствор при его смешивании до определенной температуры, что дает возможность выполнять две операции одновременно).

✓ Центрифуги.

✓ Специальная лабораторная посуда (матрасы).

✓ Микроскопы: требуются электронные модели и световые, необходимые для выполнения исследований при обычном и УФ освещении.

✓ Морозильные камеры, сосуды Дьюара с жидким азотом, сухой лед.

✓ Наборы антибиотиков, используемых для предотвращения развития микроорганизмов в культурах клеток.

Таким образом, организация, оборудование и функционирование вирусологической лаборатории является дорогостоящим мероприятием, и кроме того, требует наличия высококвалифицированного персонала.



Сосуд Дьюара CRYO-SD 6-50

3. ПРАВИЛА РАБОТЫ В УЧЕБНОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории следует в халате и шапочке на постоянно закреплённом месте.
2. На рабочем месте не должно быть ничего лишнего.
3. Во время работы необходимо соблюдать чистоту, не допускать разлива и разбрызгивания культур.
4. При работе со спиртовкой зажигают её только с помощью спичек, предварительно выпустив пары спирта из спиртовки. Гасить спиртовку следует только колпачком, который закрывают на горловине спиртовки после окончания работы.
5. В пробирки и чашки Петри материал высевают вблизи от спиртовки с обжиганием петли, краев пробирки.
6. В помещении лаборатории нельзя принимать пищу, пить воду, допускать излишние разговоры, брать использованные пипетки в рот.
7. Использованные предметные стекла, стеклянные шпатели помещают в эксикатор с дезинфицирующим раствором (3%-й раствор фенола или 1%-й раствор хлорамина). Пинцеты, бактериологические петли и другие металлические предметы перед тем, как использовать или поставить на место, необходимо прожечь в пламени спиртовки.
8. Чашки Петри и пробирки, засеянные культурами микроорганизмов, ставят в термостат, предварительно написав на них восковым карандашом фамилию исследователя, группы и дату посева.
9. При случайном попадании культуры микроорганизмов на предметы или одежду необходимо продезинфицировать их 3%-м раствором фенола с помощью ваты и пинцета. Вату после обработки поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором, который находится на лабораторном столе.
10. После окончания работы необходимо навести на своем столе порядок: микроскоп закрыть чехлом, халат и шапочку убрать в полиэтиленовый пакет, а руки тщательно вымыть с мылом.

11. Перед уходом из лаборатории сдают свой стол дежурному студенту, который сдает лабораторию дежурному лаборанту.

12. Уходя, убедитесь в том, что все электроприборы выключены. Исключение составляют холодильники и термостаты.

Полученные в процессе исследования результаты студенту необходимо подробно описать, цифровой материал свести в таблицы, если необходимо, в графики, диаграммы, рисунки. Каждая лабораторная работа должна заканчиваться собственными наблюдениями и выводами, занесенными в рабочую тетрадь.

Тетрадь для лабораторных работ служит документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных. В нее должны быть внесены сведения, имеющие отношения к выполнению данной работы. Запись необходимо вести аккуратно, четко и в определенном порядке, например:

- 1) название опыта, дата его постановки и окончания;
- 2) объект исследования;
- 3) условия проведения опыта;
- 4) основной принцип используемого метода анализа;
- 5) результаты опыта.

В конце каждого занятия необходимо получить подпись преподавателя, проводившего занятие.

4. ПРИЕМЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ

В связи с тем, что в лаборатории микробиологии ведется работа с живыми микроорганизмами, необходимо их уничтожение непосредственно после работы или после завершения целого ряда исследований.

Наиболее эффективным является уничтожение микроорганизмов в лаборатории с помощью дезинфекции. На уничтожение микроорганизмов направлена и стерилизация. По смыслу между этими терминами есть разница, хотя цель одна. Стерилизация более строгое понятие, на 100% обеспечивающая уничтожение микроорганизмов, в то время как при дезинфекции такой гарантии нет, т.к. это целый комплекс мероприятий.

Поскольку дезинфекция широко применяется в практике животноводства, в медицинских учреждениях, на предприятиях общественного питания, в торговых залах, остановимся на этом понятии более подробно.

4.1 Виды дезинфекции

Дезинфекция (франц. des. – уничтожение, удаление инфекции) – раздел эпидемиологии, изучающий и разрабатывающий средства и способы уничтожения возбудителей инфекционных заболеваний, их переносчиков в окружающей среде.

Дезинфе́кция – это комплекс мероприятий, направленный на уничтожение возбудителей инфекционных заболеваний и разрушение токсинов на объектах внешней среды. В быту мы проветриваем помещения, чтобы с потоком воздуха удалить микроорганизмы, накопившиеся в нем за время пребывания людей и домашних животных, моем руки, механически удаляя микроорганизмы, обрабатываем поверхностные царапины и ранки раствором йода или бриллиантовой зелени, т.е. предотвращаем возможное развитие инфекции – дезинфицируем. В целом понятие дезинфекции очень ёмкое. К профилактической дезинфекции относится обеззараживание питьевой воды до того, как она поступит в водопровод; пастеризация молока также направлена на уничтожение возбудителей болезней. Методами дезинфекции являются химические, физические и биологические.

По времени применения различают два вида дезинфекции: профилактическую и в эпидемиологическом очаге, которая в свою очередь делится на текущую и заключительную.

Профилактическая дезинфекция – комплекс мероприятий общего гигиенического направления с использованием дезинфицирующих средств. Профилактическая дезинфекция состоит из регулярного проветривания помещений, ежедневной влажной уборки с использованием дезсредств, обработки дезрастворами мест возможного скопления микроорганизмов. Профилактическая дезинфекция может проводиться в животноводческих комплексах, лечебно-профилактических учреждениях по разработанным инструктивным документам и включает обязательную дезинфекцию воздуха помещений с использованием ультрафиолетового облучения, стерилизацию инструментария. Профилактическую дезинфекцию проводят в благополучных по инфекционным болезням хозяйствах с целью уничтожения, возможно, занесенных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов или перед пуском в эксплуатацию помещения фермы, комплекса. Профилактическую дезинфекцию помещений для животных проводят 2 раза в год: весной – после перевода животных на пастбище и осенью – перед постановкой скота на стойловое содержание. В помещениях для откорма её проводят после сдачи животных и птицы на убой, перед комплектованием новых откормочных групп. Для медицинских учреждений разработаны свои регламенты обработок.

Одним из приемов профилактической дезинфекции является применение дезинфекционных ковриков. Известно, что микроорганизмы могут переноситься на обуви, с частичками почвы, поэтому важно предотвратить проникновение этих микроорганизмов в помещение. Дезинфекционный коврик — напольные покрытия, служащие для проведения дезинфекционных мероприятий на предприятиях сельского хозяйства, пищевой и перерабатывающей промышленности, ЛПУ (лечебно-профилактических учреждениях), в быту и т. п.

Дезинфекционные коврики состоят из 3 слоев:

1. Первый слой – мелкая крепкая сетчатая материя (ПВХ).

2. Внутренний слой – плотный мат (пенополиуретан) особой прочности, обладающий высоким эффектом впитывания.

3. Третий – нижняя и боковые части – высококачественный влагонепроницаемый материал (ПВХ) особой прочности.

Служат для дезинфекции подошвы обуви, копыт животных, колес тележек, каталок, автошин в качестве аналога ножных и копытных ванн, наливных дезбарьеров и т. п. Дезинфекционный коврик не может обеспечить надлежащий уровень санитарно-эпидемического состояния из-за чрезвычайно короткой экспозиции с очищаемым объектом (например, подошвы обуви) и быстрой нелинейной деградации активно-действующего вещества рабочего раствора дезинфицирующего средства в результате контаминации загрязнениями с очищаемого объекта. Дезинфекционный коврик не может использоваться для прохода в помещения, классифицированные как чистые помещения (*cleanroom*).

Текущая дезинфекция – проводимая систематически со дня возникновения инфекционной болезни и в течение всего времени пребывания больного человека или животного в помещении. Она направлена на предупреждение накопления и распространения возбудителей инфекции в окружающей среде и заражения здоровых людей и животных.

Заключительная дезинфекция – полное уничтожение патогенных микроорганизмов в очаге инфекции перед снятием карантина, после ликвидации в хозяйстве инфекционной болезни.

Механическую очистку и мойку животноводческих помещений производят после освобождения их от животных. Предварительно полиэтиленовой пленкой закрывают оборудование, портящееся под воздействием воды и дезинфицирующих средств. После этого струей воды под давлением смывают основную массу навоза, остатки корма и др. Наиболее загрязненные навозом места в помещении орошают горячим 2%-м раствором гидроксида натрия и через 30-40 мин производят окончательную механическую очистку и мойку помещения.

Для дезинфекции помещений используется комплекс мер – химические и физические методы, а для дезинфекции животноводческих объектов ещё используют и биологические средства.

4.2 Средства дезинфекции

Дезинфекция может осуществляться химическими, физическими или биологическими средствами. Цель ее – полное уничтожение возбудителей инфекций независимо от применяемого средства.

Химические средства дезинфекции

При работе в микробиологической лаборатории, в зависимости от уровня опасности, используют определенные приемы дезинфекции согласно нормативным документам. Режимы обеззараживания различных объектов, зараженных патогенными микроорганизмами групп III-IV предусмотрены СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Примерами средств, используемых в жизни для дезинфекции, могут служить 1%-ный раствор хлорамина Б или ХБ (самый известный и широко распространенный дезинфицирующий препарат), 1%-ный осветленный раствор хлорной извести или извести белильной термостойкой, 0,15%-ный осветленный раствор НГК (гипохлорит кальция нейтральный), 1%-ный осветленный раствор ГКТ (гипохлорид кальция), 1%-ный осветленный раствор ДСГК (двуосновная соль гипохлорита кальция), 0,5%-ный осветленный раствор ДТС ГК, 0,25%-ный раствор гипохлорита натрия, 1%-ный раствор гипохлорита натрия, 0,1%-ный раствор ДП-2 (универсальное дезинфицирующее средство, обладающее отбеливающими и дезодорирующими свойствами). Обработка оборудования, рабочего стола, индивидуальных шкафов и др. мебели проводится в течение часа (из расчета 300 мл на 1 м² поверхности), по истечении которого осуществляют влажную уборку.

Средства химической дезинфекции многочисленны и применяются в различных жизненных ситуациях, при обработке больших поверхностей в животноводческих комплексах, почвы, выгребных ям, уличных туалетов. Примерами

химических средств дезинфекции могут быть химические препараты: 2%-й горячий раствор гидроксида натрия (1 л/м^2), 3%-е растворы капсуса, парасода или фоспара ($0,5\text{ л/м}^2$); 4%-й горячий раствор демпа (1 л/м^2); 3-5%-е растворы хлорной извести (при содержании активного хлора 0,75-1,25%); аэрозоли: 20%-й водный раствор резорцина (80 мг/м^3), 10%-й раствор молочной кислоты (100 мг/м^3), йод-алюминий (0,2-0,3 г йода кристаллического, 0,01 г пудры алюминиевой и 3-4 капли воды на 1 м^3), 20%-й раствор риванола (80 мг/м^3) и др.

Химические средства дезинфекции постоянно совершенствуются с тем, чтобы их действие было направлено максимально против микроорганизмов и не вызывало отрицательной реакции у человека и животных.

Контроль результатов химической дезинфекции. Эффективность дезинфекции и качество проведения мероприятий из сферы дезинфектологии определяется специалистами санитарно-эпидемиологических служб, производственных лабораторий, иных профильных организаций.

Химический контроль дезинфекции осуществляется для проверки рабочего дезинфицирующего раствора на наличие активных химических веществ. Концентрация активного хлора или хлорсодержащих веществ, согласно СНиП, указывается в инструкции. В процессе проверки содержание дезинфектанта фиксируют записью на этикетке емкости с пробой. Количественное определение действующего химического вещества проводится в лаборатории. Если обнаружены погрешности – назначается повторная дезинфекция. Контрольные исследования при химическом методе могут проводиться с помощью **экспресс-индикаторов** (хлор-тест, пероксид-тест, «ментоловая проба», индикатор «Дезиконт»), которые подтвердят наличие активного реагента в хлорамине, перекиси водорода, хлорной извести, гипохлорите натрия или кальция.

В практике чистый хлор сейчас не используют, наиболее распространены химические дезинфектанты – хлорамины. Для приготовления рабочих растворов используют инструкцию с указанием пропорций. Соответствие концентрации дезинфицирующих средств требованиям санитарно-эпидемиологических правил

проверяется в процессе контроля качества дезинфекции. Регламентирующими документами являются: СП 3.5.1378-03, СанПиН 2.1.3.2630-10, СП 3.5.675-97.

Бактериологический вид контроля основан на взятии проб (соскобов, смывов) с поверхности предметов, белья, одежды. Как правило, такая проверка производится без предупреждения персонала общественных, школьных, и медицинских учреждений 1 раз в месяц. Цель проверки – обнаружение наличия или отсутствия кишечной, или синегнойной палочки, золотистого стафилококка. Бактериологический контроль качества дезинфекции – более сложный в исполнении, требующий определенной квалификации специалистов.

Для индикации кишечной палочки и стафилококка пробы высевают на питательную среду и термостатируют (соответственно при $T = 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 14-18 часов и $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов). Выросшие микроорганизмы исследуют под микроскопом. Наличие кишечной палочки можно определить невооруженным взглядом по изменению цвета специальной среды с индикатором pH – с малинового на зеленый, и появлением газообразования.

Физические средства дезинфекции

К физическим средствам дезинфекции относят высокую температуру, ультрафиолетовое облучение, ионизирующее излучение, ультразвук. Источниками высокой температуры могут быть сухой горячий воздух ($140\text{--}150\text{ }^{\circ}\text{C}$), водяной пар ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$), пламя спиртовки или газовой горелки ($700\text{--}800\text{ }^{\circ}\text{C}$) для обжига бактериологической петли и краев пробирок.

Воздух в лаборатории частично очищают проветриванием. Вентиляция резко снижает численность микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице температур снаружи и внутри помещения. Продолжительность проветривания не менее 30-60 мин.

Более эффективный и наиболее часто применяемый способ обеззараживания воздуха – воздействие ультрафиолетовым излучением (УФИ), обладающим высоким антимикробным действием и вызывающим гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. Из-за слабой проникающей способности ультрафиолетовое излучение не проходит через обычное стекло и легко по-

глощается частицами пыли. Поэтому для стерилизации время облучения составляет от 30 мин до нескольких часов в зависимости от степени загрязнения воздуха.

В качестве источника УФИ используют бактерицидные лампы (УФЛ). Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления и испускающая линейный спектр в ультрафиолетовой области, более 80% энергии которого приходится на длину волны 2,5 нм.

Бактерицидная лампа представляет собой стеклянную трубку, вмонтированную между двумя электрическими контактами и включаемую в сеть через дроссель. Трубка изготовлена из специального стекла, пропускающего все лучи с длиной волны 2,5 нм и задерживающего излучение с длиной волны короче 2 нм. Следует помнить, что УФИ вызывает острое воспаление роговицы глаз с характерным слезотечением и светобоязнью вскоре после облучения. Поэтому для того чтобы прямые или отраженные ультрафиолетовые лучи не воздействовали на глаза, применяют защитные очки. В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя.

Биологические средства дезинфекции

В лаборатории микробиологии эти средства не используются. Но они разработаны для других условий. Например, «Методические рекомендации 3.5.1.0101-15, 3.5.1. Эпидемиология. Дезинфектология. Дезинфекция. Биологический метод дезинфекции с использованием бактериофагов». Метод может использоваться для проведения селективной дезинфекции биологическим методом с использованием бактериофагов как средства профилактики инфекционных болезней. Этот метод может применяться для дезинфекции в инфекционных больницах против конкретных возбудителей, когда возникает высокий риск появления и распространения инфекции, оцениваемый по данным эпидемиологического анализа и микробиологического мониторинга.

Биологические средства дезинфекции с целью использования фитонцидов растений могут применяться при проведении дезинфекции в условиях фермерских животноводческих хозяйств. Из биологических средств используют фитон-

циды – вещества, продуцируемые в процессе жизнедеятельности растений и обладающие губительным свойством по отношению к микроорганизмам и плесневым грибам. Бактерицидное действие оказывают летучие вещества таких растений, как береза, черная смородина, можжевельник, крапива, чеснок, лук, алоэ и др. Эффективность этих средств уступает химической дезинфекции.

4.3 Приготовление дезинфицирующих растворов (таблица 1)

Хлорамин – кристаллическое вещество белого или слегка желтого цвета, содержащее 26-26,5% активного хлора. Хранение в темной хорошо закупоренной посуде в сухом месте не снижает содержание активного хлора длительное время. Растворы хлорамина в воде в сосудах с притертыми пробками сохраняются в течение 15 суток, не утрачивая бактерицидности. Лучше готовить раствор перед употреблением. Для растворения используют теплую воду (таблица 2).

Таблица 1 – Приготовление дезрастворов, содержащих хлор

Наименование	Концентрация, %	Назначение	Способ приготовления
Хлорная известь (активный хлор)	10 (исходный)	Для обработки контейнеров для пищевых отходов	1 кг хлорной извести растворяют в 10 л воды, отстаивают 24 ч, сливают с осадка*
	5	Для обработки раковин, умывальников, унитазов по эпидпоказаниям	5 л исходного раствора растворяют в 10 л воды
	2	Для дезинфекции оборудования и инвентаря кондитерского цеха	2 л исходного раствора разводят в 10 л воды**
	1 (рабочий)	Для обработки помещений (полов, стен, дверей и т. п.)	1 л исходного раствора разводят в 10 л воды**
	0,5	Для обработки оборудования	0,5 л исходного раствора разводят в 10 л воды**
	0,2	Для дезинфекции столовой Посуды	0,2 л исходного раствора разводят в 10 л воды**
Хлорамин Б	0,2	Для дезинфекции столовой Посуды	20 г (1 столовую ложку) растворяют в 10 л воды
	0,5	Для дезинфекции помещений, оборудования	50 г (2,5 столовых ложки) растворяют в 10 л воды
Гипохлорит кальция	0,1	Для дезинфекции столовой Посуды	10 г (1 чайную ложку) растворяют в 10 л воды

Примечание:

*Исходный раствор хранят в емкостях с плотно закрытой крышкой (пробкой) не более 5 сут. Во время приготовления исходного раствора хлорной извести следует пользоваться респираторами и защитными очками.

** Рабочий раствор готовят ежедневно.

Таблица 2 – Приготовление раствора хлорамина

Концентрация раствора, %	Количество хлорамина, г	
	на 1 л	на 10 л
0,2	2,0	20,0
0,5	5,0	50,0
1,0	10,0	100,0
2,0	20,0	200,0
5,0	50,0	500,0
10,0	100,0	1000,0

Фенол (карболовая кислота) – кристаллическое вещество, которое, поглощая из воздуха влагу, становится жидким и содержит 9% кристаллического фенола и 10% воды. При приготовлении раствора учитывают, в каком исходном состоянии находится фенол (табл. 3).

Таблица 3 – Приготовление раствора карболовой кислоты

Концентрация рабочего раствора карболовой кислоты, %	Количество кристаллической кислоты (г) для приготовления		Количество жидкой карболовой кислоты (мл) для приготовления	
	1 л	10 л	1 л	10 л
3	30	300	33	330
5	50	300	55-60	550-600

Кислоту отвешивают или отмеривают в стеклянную хорошо закрывающуюся посуду с притертой пробкой и добавляют туда отмеренный отдельно объем воды, подогретой до 50 °С. Используют раствор после полного растворения фенола.

Мыльно-карболовые растворы. Обеззараживающая способность этих растворов выше, чем чистой карболовой кислоты, так как мыло способствует проникновению фенола вглубь обеззараживающей среды.

Растворы готовят слабые (3% фенола и 2% мыла) и крепкие (5% фенола и 3% мыла). Нужно количество хозяйственного мыла с небольшим количеством

воды ставят в металлической посуде на водяную баню и растворяют при постоянном помешивании. После растворения мыла к нему вливают фенол и остальную часть горячей воды (60-70 °С) при постоянном помешивании. Для приготовления мыльно-карболового раствора в объеме 1 и 10 л берут мыло и жидкую карболовую кислоту в следующих количествах (таблица 4).

Таблица 4 – Приготовление мыльно-карболовых растворов

Раствор	Концентрация, %		Количество для 1 л, г		Количество для 10 л, г	
	карболовой кислоты	мыла	карболовой кислоты	мыла	карболовой кислоты	мыла
Крепкий	5	3	55	30	550	300
Слабый	3	2	33	20	330	200

5. МЫТЬЁ НОВОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Новую, не бывшую в употреблении посуду, моют мыльной водой. Для этого теплую воду наливают в таз и растворяют в ней хозяйственное мыло или стиральный порошок так, чтобы образовалось небольшое количество пены. В полученный раствор погружают посуду, ставят на слабый огонь и доводят до кипения. После закипания посуду вынимают, охлаждают, ополаскивают чистой водой, погружают в чистый раствор (1-2%) соляной кислоты и вновь доводят до кипения. В растворе кислоты посуду кипятят 10-15 мин, чтобы нейтрализовать избытки щелочи, которая могла остаться на посуде. Затем посуду прополаскивают водопроводной водой и дважды – дистиллированной.

Посуда для серологических исследований щелочью и кислотой не обрабатывается, так как даже следы этих веществ могут исказить результаты исследований. Такую посуду моют горячей водой, кладут на сетки, чтобы стекла вода, затем несколько раз прополаскивают дистиллированной водой. Сушить посуду можно в сушильном шкафу.

Новые градуированные пипетки моют с помощью резинового баллончика, надетого на пипетку. В пипетку насасывается мыльный раствор, чтобы вода не вытекала из пипетки. *Уровень воды в сосуде должен соответствовать высоте пипеток.* Выдержав пипетку 20-30 мин с мыльной водой, ее прополаскивают водопроводной водой и переносят в 1-2%-й раствор соляной кислоты, который постепенно доводят до кипения. Кипятят 10-15 мин, затем прополаскивают пипетки водопроводной водой и дважды – дистиллированной. Чистые пипетки сушат в сушильном шкафу.



Моечная в лаборатории

Новые предметные стекла моют в теплой мыльной воде, ополаскивают проточной, затем дважды – дистиллированной водой и заливают смесью Никифорова (этиловый спирт 96% и эфир в соотношении 1:1). Стекла могут храниться в смеси до использования, но не менее 2-3 суток.



Моечная в лаборатории

Если стекла после смеси Никифорова сохраняют следы жира, то их обрабатывают более тщательно. Стекла складывают в чистую посуду, заливают 2-5%-м раствором соды, ставят на слабый огонь и кипятят 20-30 мин (считая от момента закипания). После этого стекла ополаскивают проточной водопроводной водой и опускают в 5-10%-й раствор соляной кислоты на 10-15 мин, затем промывают проточной водой и дважды – дистиллированной. Такие стекла раскладывают на чистую фильтровальную бумагу и высушивают.

6. МЫТЬЁ ПОСУДЫ, БЫВШЕЙ В УПОТРЕБЛЕНИИ

Посуду с посевами микроорганизмов перед мытьем заливают теплой водой и кипятят на медленном огне 40 мин от момента закипания для уничтожения находящихся в ней микроорганизмов. Обеззараженную таким образом посуду вынимают, а жидкость выливают в канализацию.

Не очень загрязненную посуду далее моют ершом в горячей воде с мылом или содой, затем тщательно прополаскивают проточной водой и дважды – дистиллированной.

Более грязную посуду со следами агара, желатина или другой питательной среды заливают на сутки 2-5%-м раствором едкого натра или едкого калия, затем прополаскивают и моют ершом и щеткой, после чего тщательно прополаскивают проточной водой и дважды – дистиллированной.

Если посуда сильно загрязнена, со следами жира, ее обрабатывают хромовой смесью. Это сильный окислитель, разрушающий остатки органических веществ. Хромовую смесь перед употреблением подогревают до 45-50 °С и заливают ею посуду на 30-40 мин. При работе со смесью нужно пользоваться перчатками, нельзя насасывать смесь ртом. Посуду после обработки смесью тщательно промывают проточной водой, затем дважды – дистиллированной.

Хромовую смесь готовят двумя способами:

1. В колбу емкостью 200 мл наливают 150 мл концентрированной серной кислоты, туда же всыпают 25 г измельченного двуххромовокислого калия. Смесью взбалтывают и оставляют на сутки для растворения. Готовая смесь темно-



*Сушилка для посуды
электрическая*

оранжевого цвета. Непригодная к употреблению смесь из темно-оранжевой становится темно-зеленой.

2. В сосуде с 1 л дистиллированной воды растворяют 100 г неочищенного измельченного двуххромовокислого калия и, перемешивая жидкость, осторожно вливают в нее 100 мл концентрированной серной кислоты.

Ни в коем случае нельзя нарушать правила приготовления смеси!

Мытье градуированных пипеток, бывших в употреблении. Внутри пипетку тщательно протирают маленьким ершиком с длинной ручкой или тонкой упругой проволокой, наконеч, которой плотно накручивают кусочек ваты или марли. Чтобы загрязнения снимались быстрее и легче, пользуются горячим раствором мыльной воды, пищевой соды или стирального порошка. Закупорившийся канал пипетки прочищают мандреном от тонких игл. Промытые пипетки складывают в металлическую емкость, заливают теплым мыльным раствором и ставят на слабый огонь. После 20-30 мин кипячения пипетки вынимают и ополаскивают проточной водой, а затем дистиллированной.

Сильно загрязненные пипетки сначала также очищают ершом и мылом для удаления плотных частиц, затем ополаскивают водой, погружают в хромовую смесь, налитую в сосуд, по высоте совпадающий с длиной обрабатываемых пипеток. В хромовой смеси пипетки выдерживают 20-30 мин, затем тщательно прополаскивают проточной водой и дважды – дистиллированной.

Мытье предметных и покровных стекол. Предметные и покровные стекла должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными, чтобы капля воды, нанесенная на их поверхность, растекалась. Работать со стеклами рекомендуется в резиновых перчатках.

Бывшие в употреблении стекла опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем тщательно промывают проточной водой, затем дважды – дистиллированной.

Чистые стекла раскладывают в один ряд на фильтровальную бумагу и высушивают. Хранить стекла можно в чистой закрытой посуде в сухом виде или в смеси Никифорова (спирт и эфир 1:1).

7. СУШКА И ХРАНЕНИЕ ЧИСТОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ

Чтобы проверить, хорошо ли промыта посуда, наблюдают, как стекает с нее вода: она должна стекать, оставляя на поверхности стекла ровную водяную пленку. Образование на стенках посуды отдельных капель свидетельствует о том, что она плохо обезжирена. Такую посуду надо мыть заново. Вымытую посуду просматривают на свет: она должна быть прозрачной, без матовых пятен и налетов.

Вымытую посуду не вытирают, а дают стечь воде, размещая на специальные доски с колышками, или перевертывают вверх дном. Высушить посуду можно на воздухе или в сушильном шкафу. Для этого полки шкафа застилают фильтровальной бумагой, раскладывают посуду, шкаф закрывают и задают температуру до 100-105 °С. Время сушки определяется объемом посуды. Шкаф открывают и вынимают посуду после понижения температуры в шкафу до комнатной.

Чистую сухую посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах, а пипетки – в специальных пеналах, т.е. в местах, надежно защищенных от пыли.

В настоящее время в практику лабораторий внедряется использование разовой, стерильной лабораторной посуды. Это значительно облегчает работу, но пока что дорого.



*Сушилка лабораторная
металлическая*

8. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПОСУДЫ И ИНСТРУМЕНТОВ

Стерилизация – это полное уничтожение микроорганизмов и их спор в стерилизуемом объекте. Именно такая посуда и инструменты используются в микробиологических исследованиях.

Подготовка посуды к стерилизации. Посуда перед стерилизацией должна быть хорошо вымыта и высушена.

Сосуды, флаконы, бутылки, колбы, матрацы закрывают ватно-марлевыми пробками. Они должны входить в горлышко сосуда на 1/3 своей длины. На горлышко закрытой посуды надевают бумажный колпак, который закрепляют ниткой или резиновым колечком. Если сосуд нужно простерилизовать с резиновой, пробковой или стеклянной пробкой, его также закрывают ватно-марлевой пробкой, а нужную пробку, завернутую в бумагу, привязывают на ниточке к горлышку сосуда.

Чашки Петри завертывают в бумагу по 2-3 штуки. Чашки кладут на середину квадратного листа бумаги, сторона которого равна приблизительно трем диаметрам чашки. Лист загибают с двух противоположных сторон сверху так, чтобы края налегли друг на друга. Оставшиеся два конца бумаги завертывают вниз.

Пробирки закрывают пробками, которые не должны быть слишком плотными, так как необходимо, чтобы через них проходил воздух к культурам микроорганизмов. Длина пробки обычно 4 см и на 1,5-2 см она должна войти в пробирку. Пробка, приготовленная правильно, не вынимается из пробирки, если взять за широкую часть пробки и слегка потрясти пробирку. Закрытые пробками пробирки завертывают по 10-15 штук.

Приготовление ватно-марлевых пробок. Пробки готовят с помощью машины, а если ее нет, то следующим образом: полоску ваты слегка смачивают,



Тампон-1 - устройство намотки ватных пробок (УНВП)

скатывают в тугий валик, равный по толщине диаметру горлышка сосуда. Валик обертывают в один слой марлей так, чтобы все четыре уголка марли сходились вверху и могли быть затянуты ниткой. Чтобы придать пробке прочность, ее прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе.

Изготовленные ватно-марлевые пробки стерилизуют по отдельности или несколько штук заворачивают в плотную бумагу. Стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Пипетки. В верхние концы пипеток вкладывают кусочек ваты, предупреждающий попадание материала из пипетки в резиновые груши и шланги. Лишние волокна ваты сжигают на спиртовке. Пипетки стерилизуют либо в специальных металлических пеналах, либо их завертывают в длинные полоски бумаги (50-70 х 4-5 см). Бумагу на каждую пипетку наматывают по спирали, начиная с оттянутого конца и заканчивая у конца с ватным тампоном. При этом особенно тщательно упаковывают оттянутый конец пипетки, завертывая его сначала с трех сторон, затем наматывая бумагу вверх вдоль пипетки. На конце пипетки бумагу закручивают. Завернутые пипетки упаковывают по 10-15 штук и на бумаге пишут объем пипеток. Во время работы пипетки из пакета вынимают за верхний конец.

Шпатели завертывают по одному, начиная с треугольного конца. Шпатель кладут по диагонали на лист бумаги, равный по длине двум, а по ширине одной длине шпателя. Завертывают косячком верхнюю, затем нижнюю часть шпателя и по диагонали.

Подготовка к стерилизации ваты, марли, фильтровальной бумаги. Перед стерилизацией бумагу нарезают кусочками нужных размеров, а вату сворачивают в виде шариков или тампонов нужной величины. После этого каждый вид материала в отдельности заворачивают в плотную бумагу и стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 1 ч 30 мин – 2 ч от момента достижения указанной температуры, которая определяется по показаниям термометра.

8.1 Стерилизация сухим жаром в сушильном шкафу (печи Пастера)

Посуду, вату, марлю и другие материалы, которые не горят и не плавятся при высокой температуре, подготовленные для стерилизации, укладывают не слишком плотно на полки сушильного шкафа, хорошо закрывают дверцы и включают шкаф в сеть. Температуру в шкафу определяют по термометру, расположенному в верхней крышке шкафа. Стерилизация начинается с момента, когда температура достигает 160 °С. От этого момента отмечают 1 ч, затем шкаф отключают и ждут, пока температура упадет до комнатной. Если открыть шкаф раньше, то под влиянием струи холодного воздуха горячее стекло может лопнуть. Показателем хорошей стерилизации служит легкое пожелтение бумаги и ее хрупкость при удалении.



*Сушильный лабораторный шкаф
DION SIBLAB*

Можно стерилизовать посуду при 170 °С. Тогда время стерилизации уменьшается до 30 мин. Нагревать шкаф выше 180 °С не рекомендуется, так как бумага и вата начинают обугливаться.

Уходя из лаборатории необходимо убедиться, что сушильный шкаф выключен. Для этого достаточно взглянуть на зеленую сигнальную лампу, горящую, если шкаф работает. Однако при неисправности сигнальной лампы зеленый огонек не сработает. Поэтому самое надежное – **выключить сушильный шкаф из сети после окончания стерилизации.**

Контроль качества стерилизации осуществляют с помощью термохимических индикаторов и тестов, которые размещают в стерилизаторе при каждой обработке. Эффективность процесса определяют, используя биотесты. Это – предметы, обсемененные микроорганизмами, по результату их гибели делают заключение.

8.2 Обработка кипячением

Термин *стерилизация* в дословном переводе с латинского языка означает бесплодный, не дающий потомства. В приложении к микробиологии это означа-

ет, что в объекте не находятся микроорганизмы в любой форме и объект или вещество будут сохраняться неопределенно долго без всяких изменений. Однако, было выяснено, что споры некоторых бактерий могут сохраняться при температуре кипения воды, и даже некоторые неспоровые бактерии (кишечная палочка, ее устойчивый к высокой температуре вариант – термотолерантные колиформные бактерии), могут сохраняться после кипячения. Вирусы, в случае присутствия на иглах или в шприцах даже микроскопических капель крови или тканей, не всегда могут быть достоверно уничтожены при кипячении. Поэтому для многих стеклянных и металлических предметов, используемых при вмешательстве в организм человека или животных, предусмотрены разовые шприцы и иглы, которые после применения подлежат утилизации.

Стерилизация металлических инструментов. Ножницы, скальпели, пинцеты стерилизуют кипячением в 1-2%-м содовом растворе. Сода предупреждает появление ржавчины. Чтобы инструмент не тупился, на дно стерилизатора кладут тонкий слой стерильной марли или бинта. Кипячение ведут на медленном огне в течение 60 мин с момента закипания воды. Такая стерилизация инструмента проводится в случае, если он не сильно загрязнен.

Если предполагается, что инструмент содержит споры микроорганизмов, то лучше стерилизовать его в автоклаве при 1,5-2 атм в течение 1 ч.

Стерилизация шприцев. Шприцы стерилизуются в разобранном виде. При этом дно стерилизатора застилают тонким слоем марли. Если шприцы использовались в работе с незаразным материалом, их кипятят вместе с иглами, с мандренами, пинцетами в 2%-м растворе соды 40 мин, считая с момента закипания. Шприцы, зараженные патогенной микрофлорой, стерилизуют в автоклаве при 1,5-2 атм. в течение 30 мин.

Стерильный шприц собирают после того, как он остынет. В цилиндр осторожно вставляют поршень, а иглу надевают пинцетом, вынув предварительно из нее мандрен.

Стерилизация перчаток и других резиновых изделий. Изделия из резины (перчатки, трубки, шланги, груши) стерилизуют при загрязнении вегетативной

формой микробов кипячением в 2%-м растворе соды в течение 20-30 мин. При загрязнении спороносной формой микроорганизмов их стерилизуют в автоклаве при 1,5-2 атм. 30 мин. Эти методы приводят к быстрой порче резиновых изделий.

8.3 Стерилизация насыщенным паром под давлением (в автоклаве)

Это самый надежный способ стерилизации, ведущий к гибели всех микроорганизмов и самых устойчивых спор. Этим методом стерилизуют большинство питательных сред, перевязочный материал и т.д.

Автоклав состоит из двух котлов, вставленных друг в друга, металлического цилиндра, кожуха и крышки. Работа автоклава проходит под давлением, поэтому массивная металлическая крышка плотно привинчивается специальными винтами. Наружный котел автоклава называют водопаровой камерой, внутренний – стерилизационной камерой. В наружном котле происходит образование пара из воды, откуда через небольшие отверстия пар проходит во внутренний котел, где находится стерилизационный материал. Для определения давления пара в этой камере служит манометр. При этом нормальное атмосферное давление – 760 мм рт.ст. – принимается за нуль. В неработающем автоклаве стрелка манометра стоит на нуле. Между показателями манометра и температурой кипения воды в автоклаве имеется определенная зависимость (таблица 5).

Таблица 5 – Соотношение показаний манометра и температуры воды

Показания манометра, атм	Температура кипения воды, °C
0	100
0,2	105
0,4	110
0,5	111,7
0,7	115
1,0	120,6
1,5	127,8
2,0	132,9
2,5	139,2
3,0	144

На шкале манометра имеется красная черта, которая определяет максимальное рабочее давление, допускаемое в автоклаве. Чтобы давление не поднималось выше критического, в крышке автоклава имеется предохранительный клапан, открывающийся автоматически, как только стрелка манометра достигнет красной черты, и выпускающий лишний пар.

Предупреждением о перегреве автоклава служат свист и шипение вырывающегося пара. В таком случае автоклав надо немедленно выключить из сети.

На боковой стенке автоклава находится водомерное стекло, показывающее уровень воды в водопаровом котле. На трубке водомерного стекла две горизонтальные черты – нижняя и верхняя, обозначающие соответственно нижний и верхний уровень воды в наружной камере (водопаровой) камере.

В автоклаве имеется воздушный выпускной кран, предназначенный для удаления воздуха из стерилизационной и водопаровой камер в начале стерилизации, так как воздух является плохим проводником тепла, нарушает режим стерилизации и дает конденсацию пара. На этот кран надевают резиновый шланг, который опускают в ведро с водой.

Конденсационный кран расположен на дне автоклава. Через него стерилизационная камера освобождается от конденсата, образующегося в период нагревания стерилизуемого материала.

Правила работы с автоклавом. Открывают вентиль, соединяющий котел со стерилизационной камерой. Стерилизационную камеру автоклава загружают стерилизуемым материалом. Выливают из автоклава старую воду через нижний кран, соединяющий котел с водомерной трубкой, а в водопаровую камеру через воронку заливают воду до красной черты на водомерной трубке. Крышку автоклава закрывают, привинчивают болтами к корпусу и открывают конденсационный и выпускной краны, включают автоклав в сеть. На распределительном щитке автоклава тумблер ставят в положение "Нагрев".

При закипании воды из выпускного крана по отводной трубке, опущенной в ведро с водой, начинают выходить большие пузыри воздуха с мягким булькающим звуком. Затем начинает выходить вместе с паром лишь небольшое коли-

чество мелких пузырьков, состоящих из не успевшего сконденсироваться пара. Вслед за этим непрерывной струей с резким треском из трубки начинает вырываться струя чистого сухого пара. Выход струи пара соответствует температуре закипания воды – 100 °С. Этот момент свидетельствует об удалении воздуха из автоклава. После этого выпускной кран закрывают, вынимают из ведра с холодной водой отводную трубку и начинают поднимать давление до необходимой нам величины в пределах 2 атм.

Началом стерилизации считается тот момент, когда стрелка манометра показывает необходимое давление. После этого интенсивность подогрева нужно уменьшить, чтобы давление больше не поднималось. Для этого поворачивают переключатель в положение "Стерилизация". По окончании времени стерилизации переключатель на распределительном щитке ставят в положение "выкл.", автоклав отключают, закрывают вентиль, соединяющий стерилизационную камеру с котлом, и ждут, пока давление упадет до атмосферного, и на манометре стрелка будет показывать ноль. Открывают пароотводный кран и выпускают весь пар. Открывают крышку автоклава на себя, чтобы оставшийся пар пошел в сторону и не вызвал ожогов. Вынимают простерилизованный материал и выпускают через конденсационный кран конденсат, образовавшийся в стерилизационной камере, после чего кран закрывают.



Автоклавная в лаборатории

Нельзя открывать кран преждевременно, так как горячие среды бурно закипают, смачивают или даже выталкивают ватные пробки, делая среды нестерильными.

Нельзя слегка приоткрывать кран, погружая водоотводную трубку в сосуд с холодной водой. В результате создающейся разницы давления вода из ведра засасывается в автоклав (стерилизационную камеру) и закупоривает ее.

Простерилизованный материал следует оставить при полуоткрытой крышке автоклава на 3-5 мин для обсушки ватных пробок в колбах или пробирках.

После работы воду из автоклава выливают. Он должен содержаться в сухом состоянии.

Периодически необходимо проверять, соответствуют ли показания манометра температуре в стерилизационной камере.

Для этого используют порошкообразные химические вещества со строго определенной точкой плавления, смешивают их с ничтожно малым количеством краски (метиленовой синью, фуксином, сафранином). Смесь насыпают в маленькие пробирки, хорошо закрывают корковой пробкой и помещают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. При распределении порошка образуется сплав, окрашенный в цвет добавленной краски. В качестве температурных индикаторов используют различные вещества (таблица 6).



Лента индикаторная для паровой стерилизации

Таблица 6 – Температура плавления веществ, используемых для контроля стерилизации в автоклаве

Вещество	Температура плавления, °C
Бензонафтол	110
Антипирин	115
Серный цвет	115
Резорцин чистый	118
Сера	119
Бензойная кислота	121

Контроль стерилизации может осуществляться с помощью **индикаторных лент**. Ленточные индикаторы представляют собой бумажную ленту на липкой основе с термочувствительными химическими индикаторами. Обычно используемые термочувствительные ленты включают диагональные полосы (автоклава лента) и / или слово «стерильный». Эти отметки появляются только то-

гда, когда лента подвергается в течение нескольких минут воздействию обычных температур автоклавирования.

Внутренние ленточные индикаторы **должны быть помещены в каждую стерилизационную упаковку, чтобы гарантировать, что стерилизующий агент проник в упаковочный материал** и действительно достиг изделий внутри. Внешний индикатор следует использовать, когда внутренний индикатор не виден снаружи упаковки.

Биологические индикаторы (БИ) являются наиболее распространенным средством **мониторинга процесса стерилизации**, поскольку они напрямую определяют наличие наиболее устойчивых микроорганизмов (например, виды *Geobacillus* или *Bacillus*), а не просто определяют, соблюдены ли физические и



Контроль качества стерилизации

химические условия, необходимые для стерилизации. Поскольку споры, используемые в БИ, более устойчивы и присутствуют в большем количестве, чем обычные микробные загрязнители, обнаруживаемые на медицинских изделиях, инактивированный БИ указывает на то, что другие потенциальные патогены в нагрузке также были убиты.

Биологические индикаторы предназначены для демонстрации того, что автоклав способен убивать микроорганизмы. Специалисты рекомендуют использовать коммерчески доступные **споры *Bacillus stearothermophilus*** для контроля эффективности паровых автоклавов. Этот тест необходимо проводить не реже одного раза в 90 дней.

Споры *Bacillus stearothermophilus* погибают при 121 °С в течение 15 минут, когда они содержатся в 1 мл среды из 10^6 клеток. Между стерилизуемыми изделиями помещают пробирки с полосками марли, фильтровальной бумаги, с шелковой нитью, зараженные спорами. После стерилизации в пробирку добавляют питательный бульон (МПБ) и наблюдают за ростом микроорганизмов. Присутствие помутнения является признаком роста бактерий, это говорит о том, что автоклав не способен уничтожить микроорганизмы и их споры, и наоборот, если питательная среда остается прозрачной – автоклав исправен и способен уничтожать микроорганизмы.

Биологические индикаторы могут выпускаться в различном виде – полоски со спорами являются традиционными БИ, используемыми для контроля процессов стерилизации паром, этиленоксидом, сухим теплом и гаммаэлектронным лучом. Они содержат бактериальные споры на полоске бумажного носителя в отслаиваемой оболочке из пергамента. Для использования полоску спор снимают с бумажного носителя и асептически переносят в соответствующую микробиологическую культуральную среду. При росте культуры стерилизации не было. Биохимическая активность микроорганизма приводит к образованию кислых побочных продуктов, которые при переносе в стандартный бульон будут демонстрировать заметную мутность, а в случае использования питательной среды с рН-индикатором, культуральная среда будет иметь заметное изменение цвета. Мутность или визуальное изменение цвета рН-индикатора указывают на сбой процесса стерилизации.

В зависимости от способа стерилизации применяют для ее контроля различные виды микроорганизмов, температуру и их концентрации:

- *Bacillus atrophaeus* – 106 (37 °С) – для проверки стерилизации сухим жаром и оксидом этилена;
- *Bacillus pumilus* – 106 (35 °С) – для гамма/электронно лучевого излучения;
- *Geobacillus stearothermophilus* – 105 (60 °С) для контроля паровой стерилизации.

В каждом из этих методов контроля стерилизации необходима выдержка культуры в течение 7 дней в культуральной среде при указанной температуре.

8.4 Электронно-лучевое излучение как метод обработки с целью уничтожения микроорганизмов в продуктах (один из видов стерилизации)

Это радиационная обработка продуктов питания, медицинской и с.-х. продукции. Электронно-лучевое (ЭЛ) излучение не предполагает глубинного проникновения в толщу продукта, как это делает гамма-излучение. В зависимости от плотности продукции ЭЛ-излучение проникает в продукт на глубину до 40 см от поверхности. Действие ЭЛ-



Установка радиационной стерилизации

излучения ограничивается несколькими секундами, в отличие от многочасового воздействия на продукт гамма-излучением. Кратковременность воздействия ускоренных электронов снижает возможные эффекты окисления, сводя к минимуму нарушения в структуре как продукта, так и упаковочного материала. Стоимость стерилизации ионизирующим излучением в 4-5 раз дешевле, чем использование пара.

Электронно-лучевой способ использует высокий уровень энергии электронов в качестве средства стерилизации. Электроны ускоряются до скорости света с помощью линейного ускорителя. Энергия электронов в диапазоне от 3 до 10 млн. электронвольт (МэВ) с мощностью пучка в диапазоне от 1 до 10 кВт оказывается достаточной для проникновения в продукт, герметично упакованный в готовую к отгрузке тару.

Электроны, сканируя продукт, проходят через множество вторичных частиц, включая ионы и свободные радикалы. Вторичные частицы разрывают ДНК-цепочки микроорганизмов и на внутренней поверхности упаковки, и внут-

ри продукта, блокируя таким образом их дальнейшее размножение. Патогенные микробы разрушаются, и вследствие этого происходит стерилизация продукции.

8.5 Гамма-стерилизация для увеличения срока хранения продуктов

Консервирование – способ консервации пищевых продуктов (изготовления консервов), заключается в технической обработке продуктов питания для угнетения жизнедеятельности, портящих продукты микроорганизмов. А также некоторые другие способы повышения срока хранения пищевых продуктов. В широком смысле под консервированием подразумевается любой процесс, значительно удлиняющий сохранность продуктов в пригодном для употребления в пищу виде. Основная задача консервирования – свести уровень активности воды до минимального уровня, что лишает вредные микроорганизмы среды обитания для дальнейшего развития и порчи продукта.

Гамма-излучение (гамма-лучи, γ -лучи) – вид электромагнитного излучения, характеризующийся чрезвычайно малой длиной волны – менее $2 \cdot 10^{-10}$ мкм – и, вследствие этого, ярко выраженными корпускулярными и слабо выраженными волновыми свойствами. Относится к ионизирующим излучениям, то есть к излучениям, взаимодействие которых с веществом способно приводить к образованию ионов разных знаков.

Облучение продуктов питания – процесс, заключающийся в подвергании их воздействию ионизирующего излучения с целью уничтожения микроорганизмов, бактерий, вирусов или насекомых, которые могут присутствовать в пище. Эта обработка используется для повышения безопасности пищевых продуктов за счёт увеличения срока годности продукта, и, как результат, снижая риск возникновения болезней пищевого происхождения. Прочие сферы применения включают в себя ингибирование прорастания, задержку созревания, увеличение количества получаемого сока и улучшение процесса регидратации. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) и Министерство сельского хозяйства США (USDA) провели исследования, которые подтверждают безопасность процесса облучения.

Облучение пищевых продуктов разрешено более чем в 60 странах, причём ежегодно во всем мире перерабатывается около 500 000 тонн пищевых продуктов. Правила, предписывающие, как следует облучать пищевые продукты, сильно различаются в разных странах. В Австрии, Германии и многих других странах Европейского союза только сушеные травы, специи и приправы можно обрабатывать облучением и только в определённой дозе, в то время как в Бразилии разрешена обработка всех продуктов питания в соответствующих дозах.

Облученная пища не становится радиоактивной, так же как объект, подверженный воздействию света, не начинает излучать свет.

Радиоактивность – это способность вещества испускать частицы высокой энергии.

9. РАБОТА С ПРИБОРАМИ В ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ

9.1 Правила работы с термостатом

Термостаты бывают суховоздушные и водяные. Они предназначены для инкубирования микроорганизмов при заданной температуре.

Термостаты периодически открывают, что приводит к оседанию на поверхности их стенок разнообразной воздушной микрофлоры. Обсеменяются они и спорами микроскопических грибов и актиномицетов при культивировании их в чашках Петри в большом количестве. Все это ведет к загрязнению чистых, выращиваемых в термостатах, культур микроорганизмов и особенно посевов в чашках микроорганизмов, взятых из разных образцов: почвы, воды, воздуха, молока, мяса. Чаще всего эти посевы обсеменяются спорообразующими грибами – мукором, аспергиллами, пенициллами.

В целях предупреждения негативных последствий и получения неискаженных результатов необходимо 1 раз в неделю проводить стерилизацию термостата. Для этого сначала проводят влажную уборку в термостате и удаляют из него посевы.

После просыхания термостата берут длинный пинцет, на него по спирали наматывают вату. Пинцет с ватой опускают в спирт и поджигают. Этим спиртом в пламени протирают все стенки термостата и решетки. Осторожно, не перегревая, следует работать в области размещения терморегулятора. В случае перегрева он может лопнуть.



Баня лабораторная 4-местная



*Облучатель
ртутно-кварцевый
Завет ОРК-021*

После стерилизации термостат закрывают. Дверцы предварительно также протирают спиртом в пламени.

9.2 Правила работы с водяной баней

Водяная баня используется для создания необходимой температуры при проведении каких-либо анализов, для расплавления питательных сред, для дробной стерилизации. Правила работы с водяной баней:

1. Водяную баню необходимо заправлять только дистиллированной водой для предотвращения появления накипи на тэнах и стенках прибора, а также на поверхности используемой посуды.

2. Следить за чистотой используемой воды, по необходимости баню мыть и менять воду полностью.

3. Нельзя включать водяную баню, если недостаточен уровень воды, не допускать оголения тэнов.

4. При необходимости удалять накипь со стенок и тэнов. Для этого можно использовать слабый раствор уксусной кислоты.

9.3 Правила работы с облучателями

Облучатель ртутно-кварцевый ОРК-2 предназначен для профилактического и лечебного воздействия ультрафиолетовыми лучами. В лаборатории используется для облучения воздуха.

Облучатель ультрафиолетовый УГД-2 используется для облучения помещения.

При работе с облучателями для защиты глаз необходимо пользоваться специальными защитными очками.

Во избежание ожога следует соблюдать осторожность: детали головки при облучении значительно нагреваются.

Помещение, в котором проводится облучение, должно хорошо проветриваться, так как образующиеся в процессе ультрафиолетовой радиации озон и окислы вредны для здоровья.



*Облучатель
ультрафиолетовый УГД-2*

В случае боя ламп необходимо собрать ртуть резиновой грушей и место, где разбилась лампа, промыть 1%-м раствором марганцово-кислого калия.

Лампы, вышедшие из строя, следует сдавать в специальные пункты для дальнейшей утилизации.

Порядок работы с облучателями. Вставить вилку шнура питающего устройства в розетку сети и произвести включение кнопкой "Пуск". При этом лампа должна загореться, в питающем устройстве должно слышаться негромкое гудение дросселя. В случае, если лампа не загорается, необходимо повторить включение.

Повторное включение облучателя возможно только после охлаждения лампы, для этого обычно требуется не более 10-15 мин.

Облучение считается начатым спустя 15 мин после включения. За это время устанавливается ее режим.

Техническое обслуживание. Лампу необходимо не реже одного раза в неделю протирать ваткой, слегка смоченной в спирте. Включать облучатель можно лишь тогда, когда лампа полностью высохнет.

Лампу рекомендуется включать не более чем на 3 ч в сутки для более длительной ее эксплуатации.

Дистилляторы предназначены для очистки воды методом дистилляции. Полностью автоматический электрический аквадистиллятор Liston A 1210 из нержавеющей стали. Предназначен для получения очищенной воды согласно Фармакопее.

Дистилляция воды – перегонка жидкости, включающая процесс испарения с последующим охлаждением, в результате которого пары конденсируются и выпадают в виде капель.

9.4 Безопасная эксплуатация боксов биологической безопасности

Начало работы в боксе.



*Аквадистиллятор
электрический Liston A1210*

1. Для защиты рук наденьте перчатки.
2. Перед началом работы внесите и разместите в боксе все необходимые для работы предметы.
3. Протрите поверхность рабочей зоны и все внутренние стены.
4. Включите бокс и не начинайте работу в течение нескольких минут.
5. Не перегружайте рабочую зону предметами.
6. Перед началом работы закройте сливное отверстие.

Работа в боксе.

1. Не закрывайте передние и задние решетки воздухозабора.
2. Работайте в боксе как можно дальше.
3. Минимизируйте движения рук; во время работы все движения должны быть медленными, не возмущающие потоки воздуха.
4. Убирая руки из рабочей зоны бокса, следите, чтобы движения были медленными, перпендикулярными плоскости открытого пространства под фронтальной панелью.
5. Не забывайте проводить дезинфекцию поверхности.
6. Минимизируйте влияние всех посторонних потоков воздуха извне (сквозняки и т.п.).
7. Работайте по принципу "от чистого к грязному".
8. Пакеты для биологических отходов должны быть размещены внутри рабочей зоны, а не снаружи бокса.
9. При разливе жидкостей рекомендуется использовать абсорбирующие губки, минимизирующие образование аэрозолей и брызг.
10. Убирая потенциально загрязненные предметы из рабочей зоны бокса, протрите их поверхность.
11. Размещайте оборудование, работа на котором может привести к образованию аэрозолей, как можно дальше в боксе.
12. Во избежание кросс-контаминации чистые предметы следует размещать на расстоянии не менее 15 см от оборудования, работа на котором может привести к образованию аэрозолей.

13. Чашки Петри, планшеты и т.п. следует накрывать крышками.

14. Не используйте газовые горелки, их пламя влияет на воздушные потоки бокса биологической безопасности.

15. Размещайте оборудование, которое вызывает турбулентные потоки (центрифуги, блендеры, ультразвуковые гомогенизаторы и т.п.) на расстоянии 1/3 от задней стенки бокса.

Окончание работы в боксе.

Максимальную защиту обеспечивают постоянная, по возможности, работа бокса биологической безопасности и дезинфицирование поверхности всех используемых в работе предметов.

1. Если в работе были использованы пакеты для биологических отходов – запечатайте их.

2. Проведите дезинфицирование всех внутренних поверхностей бокса: стен, задней стенки, рабочей поверхности, сливного поддона, внутренней поверхности стекла фронтальной панели.

3. Оставьте бокс в рабочем режиме дополнительно на 5 минут, чтобы прошло достаточное количество циклов очистки воздуха.

4. Опустите стекло фронтальной панели и включите ультрафиолетовую лампу.

Содержание бокса в исправном состоянии.

1. Рекомендованный срок замены префильтра: каждые 3 месяца.

2. Рекомендованный срок замены УФ-лампы: раз в год.

3. Рекомендовано регулярное проведение валидации: проверка систем сигнализации, проведение измерений воздушных потоков и т.д.

10. ПРАВИЛА РАБОТЫ С КОЛЛЕКЦИЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

В учебной лаборатории микробиологии, как правило, работают с коллекцией только сапрофитных микроорганизмов. Патогенные микроорганизмы студентам показывают лишь в готовых убитых окрашенных препаратах.

Сапрофитные бактерии капризны в хранении. Они нуждаются в более частом пересеве (не менее 1 раза в месяц), чем культуры микроскопических грибов, актиномицетов, т.е. культур, размножающихся отрывками мицелия и спорами.

Культуры сапрофитных бактерий для хранения в музее пересевают на большой столбик агара или большой косячок, для получения которого наливают до половины пробирки питательную среду. Среду стерилизуют в пробирках,



Музей Микропия Амстердам

слегка скашивают и после застывания высеивают культуру слабым штрихом.

После двух дней выращивания в термостате культуры ставят в чистый целлофановый мешочек и помещают в сейф с пометкой даты посева всей партии или на одной пробирке партии.

Через месяц из этих пробирок делают посев на такую

же питательную среду в другие пробирки.

Процесс повторяют ежемесячно. Таким способом сохраняют и поддерживают в коллекции все бациллы, бактерии, кокки, сарцины.

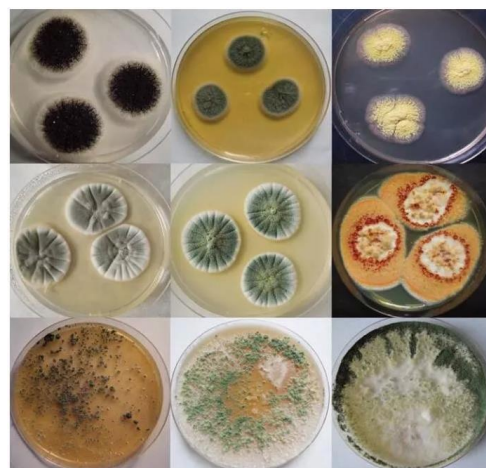
Непатогенные спириллы рекомендуется пересевать один раз в 10 дней.

Сапротрофные микроорганизмы, разрушающие целлюлозу, растут медленно. Для них необходимо в полужидкую питательную среду с 1% агара, разли-

тую в пробирки, поставить столбик, свернутый из фильтровальной бумаги размером 2х4 см на стеклянной палочке. После скашивания среды провести посев по поверхности фильтра и поставить на 7 дней в термостат. При появлении роста пробирки поставить в целлофановый мешочек и поместить в сейф с указанием даты посева. Посев – 1 раз в месяц. Таким образом, пересевают вибрионы, разрушающие клетчатку, микробактерии, актиномицеты и грибы.

Обычные сапрофитные микроскопические грибы и актиномицеты, выращенные в пробирках на больших косячках агара, можно не пересевать 2-3 месяца.

В чистой культуре грибы актиномицеты долгое время сохраняют свою жизнеспособность, что дает возможность длительное время поддерживать их коллекции, чтобы в любое время использовать культуру для необходимых целей, сделав посев на соответствующую питательную среду.



*Колонии плесени в чашке
Петри*

Все культуры в одной повторности хранятся в сейфе и в одной – повторности в холодильнике. Это дает возможность поддерживать коллекцию в случае непредвиденных обстоятельств, например, отключили энергию, оттаял холодильник, пробки культур в коллекции замekli и культуры погибли. В этом случае основной является культура, сохраняемая в сейфе.

11. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ХИМИЧЕСКИМИ РЕАКТИВАМИ

11.1 Виды химических реактивов

Химические реактивы выпускаются в продажу следующих квалификаций: чистый (ч.), чистый для анализа (ч.д.а.), химически чистый (х.ч.) и особой чистоты (ос.ч.).

Реактивы особой чистоты применяются только тогда, когда в этом имеется особая необходимость, например, при определении микроэлементов.

Химически чистые реактивы используются для приготовления эталонных растворов, а также буферной смеси.

Чистые для анализа, а иногда и чистые реактивы употребляют для приготовления титрованных растворов.

Процентные растворы, а также растворы для вытяжек обычно готовят из чистых реактивов, если нет особых требований к качеству реактивов.

Технические продукты, например, техническая серная и соляная кислоты и очищенные препараты (о.ч.) служат для мытья посуды, приготовления охлаждающих смесей и солевых ванн.

Реактивы испытывают на чистоту путем определения в них примесей, которые затрудняют ход анализа или искажают его результаты. Например, соляную кислоту для определения следует проверять на содержание железа.

11.2 Правила обращения с химическими реактивами

1. Реактивы полагается брать в таком количестве, которое необходимо для разового использования.

2. Отвешивать реактивы на аналитических весах следует в химически чистой посуде: в боксе, небольшом химически чистом стаканчике или на часовом стекле. Высыпать обратно излишек взятого реактива не разрешается. При взятии навесок на технических весах используют химический стакан или фарфоровую чашку.

3. Порошкообразные реактивы отбирают пластмассовыми или фарфоровыми ложечками, или шпателями. Применение металлических шпателей недопустимо, так как это может привести к порче реактивов, особенно если они имеют кислую или щелочную реакцию.

4. Банки и склянки нельзя оставлять открытыми, так как реактивы загрязняются пылью, поглощают влагу или загрязняют воздух.

5. Концентрированные растворы щелочей и кислот, а также ядовитые и неприятно пахнущие жидкости нельзя отбирать пипеткой посредством засасывания ртом. В этом случае пользуются пипеткой с резиновым баллоном или же отмеривают жидкости измерительным цилиндром.

6. Концентрированные кислоты, а также аммиак, хранят в склянках с притертыми пробками, закрытыми стеклянными колпачками.

7. При открывании банки и склянки с реактивами полагается ставить на чистое стекло нижним концом вверх. Менять пробки от бутылей и склянок не разрешается.

8. На банках, склянках с реактивами всегда должна быть надпись!

9. Прежде чем отлить реактив, следует протереть горлышко около пробки, чтобы не загрязнить раствор посторонними примесями.

12. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОКРАШИВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Из сухих красителей, продающихся в виде порошков, готовят насыщенные спиртовые растворы, сохраняющиеся впрок, но сами по себе непригодные для окраски бактерий. К спирту прибавляется столько сухого красителя, чтобы на дне оставался нерастворимый осадок. Из этих насыщенных растворов готовятся разбавленные водно-спиртовые растворы красителей для окрашивания микробов. Растворы эти не так прочны, как спиртовые, но и они могут служить в течение месяца. Иногда готовятся для окраски и водные (без спирта) 1-2%-е растворы сухих красителей. Водные растворы непрочны.

Для усиления действия красителей пользуются:

- 1) увеличением их концентрации;
- 2) прибавлением к растворам красителей таких веществ как анилин, щелочи, карболовая кислота, формалин и др.;
- 3) увеличением продолжительности окраски;
- 4) нагреванием красящего раствора.

Следует заметить, что продолжительное окрашивание слабыми растворами красителей дает препараты более чистые и потому более отчетливо окрашенные, чем быстрое окрашивание концентрированными красителями.

Метиленовая синь – употребляется несколько вариантов красителя.

Насыщенный спиртовой раствор: к 10 мл 96% спирта прибавляют 3 г порошка метиленовой сини, оставляют на несколько дней (при этом нужно несколько раз встряхивать), после чего раствор отфильтровывают. Для употребления синь разводят в 5-10 раз (в зависимости от силы красителя) дистиллированной водой. Раствор отличается прочностью.

12.1 Красители и реактивы для окраски по Граму

1. *Феноловый раствор генциана фиолетового:* генциан фиолетовый – 1 г, спирт 96%-й – 10 мл, фенол кристаллический – 2 г, вода дистиллированная – 100 мл.

В некоторых случаях применяют *спиртовой раствор генциана фиолетового*: генциан фиолетовый (или кристаллический фиолетовый) – 1 г, спирт 96%-й (ректификат) – 100 мл, глицерин – 5 мл. Бутыль со смесью ставят в термостат на 24 ч (можно и дольше), затем фильтруют.

2. *Раствор Люголя* (йодит калия – 2 г, йод кристаллический – 1 г, вода дистиллированная – 300 мл). Вначале готовят концентрированный раствор йодита калия в 5 мл воды, в нем растворяют йод, потом добавляют воду до 300 мл.

3. *Спирт 96%-й*.

4. *Фуксин Пфейфера* (водный раствор карболового фуксина Циля): 1 мл карболового фуксина Циля и 9 мл дистиллированной воды.



Набор для окраски по Граму

12.2 Красители и реактивы для окраски кислотоустойчивых бактерий

1. *Карболовый фуксин Циля*: фуксин основной – 1 г, карболовая кислота кристаллическая (фенол) – 5 г, спирт 96%-й – 10 мл, глицерин – несколько капель, вода дистиллированная – 100 мл. Основной фуксин растворяют в этаноле и затем добавляют растворенный в воде фенол. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на несколько дней. Перед использованием его фильтруют.



Набор для окраски мазков по Циль-Нильсен

2. *Метиленовый синий Леффлера*: 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают со 100 мл 0,01%-го раствора КОН. Насыщенный спиртовой раствор метиленового синего готовят следующим образом: 1,6 г метиленового синего растворяют в 100 мл 95%-го этилового спирта.

3. *Серная кислота* – 5%-й раствор или *соляная кислота* – 3%-й раствор.

12.3 Реактивы для окрашивания спор бактерий

1. *Карболовый фуксин Циля.*
2. *Метиленовый синий Леффлера.*
3. *Насыщенный водный раствор метиленового синего.* 2 г красителя и 100 мл дистиллированной воды.
4. *Хромовая кислота, 5%-й раствор.*
5. *Соляная (или серная) кислота, 1%-й раствор.*

12.4 Окраска капсул по методу Бури

Приготовление туши

Одну часть туши смешивают с девятью частями дистиллированной воды и стерилизуют при 1 атм. 30 мин в пробирках, закрытых ватными пробками. Вместо стерилизации можно добавлять к туши несколько капель формалина. Подготовленную таким образом тушь выдерживают две недели, пока все взмученные частицы не осядут на дно. Для приготовления препарата осторожно берут только верхнюю часть отстоявшей жидкости.

13. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Питательные среды применяют для выращивания микроорганизмов, выделения их в чистой культуре, изучения ряда свойств микробов и длительного сохранения культур.

13.1 Использование сухих питательных сред

Сухие питательные среды следует хранить герметически закрытыми, и, по возможности, не на свету, так как препараты гигроскопичны и светочувствительны. Увлажнение, комкование и изменение цвета порошка свидетельствуют о понижении качества препарата. Сухие препараты, не содержащие глюкозу, даже при комковании могут не терять своих качеств, однако их пригодность следует проверить. Наличие же в сухой среде глюкозы комкования и изменение цвета порошка свидетельствуют о порче.



Сухие питательные среды для микробиологи

Для приготовления питательных сред из сухих препаратов навеску, указанную на этикетке, высыпают в стеклянную колбу и заливают холодной дистиллированной водой. Смесь необходимо хорошо размешать до полного смачивания порошка водой. Затем в водяной бане смесь нагревают и доводят до кипения, периодически помешивая. Кипятят до тех пор, пока порошок окончательно не растворится. Растворение в колбонагревателе возможно, но требует большого внимания, чтобы не допустить пригорания среды.

Сухой питательный агар. Фильтрование проводят через вату и марлю, пока среда горячая, желательно в теплой комнате. Можно также поступить следующим образом: 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 ножом отрезают мутную часть. Прозрачный агар расплавляют и заливают для стерилизации.

Стерилизуют под давлением 1 атм. 1 мин или дробным методом (3-кратная обработка при температуре 100 °С в водяной бане в течение 30 мин с последующим проращиванием спор).

Среда Эндо. Приготовленную смесь кипятят 3-5 мин, не допуская пригорания, с закрытой пробкой. Если производится фильтрация, повторно доводят среду до кипения. Дополнительной стерилизации не требуется.

Горячий агар имеет бледно-розовый цвет, при застывании он становится бесцветным. Среду готовят и разливают в стерильные чашки Петри в день посева. Чашки со средой следует защищать от света, иначе она покраснеет.

13.2 Приготовление синтетических питательных сред

Минеральные соли отвешивают и растворяют в отдельных колбах в небольшом количестве дистиллированной воды. Затем растворы солей последовательно сливают в мерную посуду и добавляют воду до определенного объема. В дальнейшем к солевому раствору добавляют различные вещества, используемые микроорганизмами в качестве энергетического материала, источников азота и углерода. Например, для целлюлозоразрушающих бактерий добавляют бумагу и соль аммония, для азотфиксирующих аэробных бактерий – глюкозу и т.д. Затем добавляют агар, среду на водяной бане доводят до кипения и полного растворения агара. Затем стерилизуют.

Часто в агаре содержатся примеси, которые задерживают рост некоторых групп бактерий (например, аэробных целлюлозоразрушающих – среда Гетчинсона). Поэтому агар перед употреблением должен быть тщательно промыт водой. Для этого нужное количество агара отвешивают, помещают в двойной марлевый мешочек, прикрепляют к водопроводному крану и в струе проточной воды промывают в течение 3-4 ч.

Крахмало-аммиачный агар имеет следующий состав, г на 1 л дистиллированной воды:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	1
NaCl	1

Мел	3
Крахмал	10
Агар	20

Сначала растворяют соли и добавляют мел, затем часть среды отливают и в ней растворяют крахмал. Остальную часть доводят до кипения, после чего при непрерывном помешивании к ней добавляют часть среды с крахмалом. После этого добавляют агар-агар и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм. 20 мин.

Среда Чанека имеет следующий состав, г на 1 л дистиллированной воды:

Сахара и глюкоза	30
NaNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
Агар	15-20

Среду стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. или дробно. Перед разлитием среду необходимо подкислить до pH 5,0. Подкисленную среду нельзя расплавлять повторно, так как агар теряет свои коллоидные свойства.

Среда Гетчинсона, г на 1 л дистиллированной воды:

K ₂ HPO ₄	1
CaCl	0,1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3
NaCl	0,1
FeCl ₂	0,01
NaNO ₃	2,5

В качестве источника углерода используют бумажный фильтр. Фильтры предварительно стерилизуют в печи Пастера при температуре 120 °С в течение одного часа.

При использовании жидкой среды Гетчинсона фильтр кладут на поплавки. Если необходимо использовать плотную среду, то в описанный выше состав добавляют 2% агара и фильтр кладут на застывшую среду.

Среда Эшби, г на 1 л дистиллированной воды:

Маннит	20
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄	0,2
NaCl	0,2
K ₂ SO ₄	0,1
CaCO ₄	5,0
Агар	20

Стерилизуют при 1 атм 20 мин или дробно.

Среда Виноградского для нитрификаторов, г на 1 л дистиллированной воды:

(NH ₄) ₂ O ₄	20
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
NaCl	2
FeSO ₄	0,4
CaCO ₃	5

Стерилизуют при 1 атм 20 мин или дробно.

Среда Виноградского безазотистая для анаэробных фиксаторов азота, г на 1 л дистиллированной воды:

K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,5
FeSO ₄	0,01
Глюкоза	20

Питательную среду разливают в пробирки высоким слоем по 10 мл и вносят в каждую мел из расчета 2 г на 100 мл для нейтрализации образующихся кислот. Стерилизуют при 1 атм 20 мин или дробно.

Разливают агаризованные питательные среды в пробирки, чашки Петри или другую посуду в зависимости от целей исследований.

Перед разливом среды расплавляют в водяной бане при температуре 100 °С, затем дают остыть до 60-50 °С.

Следует помнить, что при высокой кислотности и многократном нагревании при высокой температуре свойства агаровых сред падают.

Разливают в чистой комнате, где предварительно произведена влажная обработка, или в облученной бактерицидной лампой, с соблюдением условий стерильности.

Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, предохраняющими культуры от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе, и от высыхания. Через пробирки идет газовый обмен культуры с окружающей средой, поэтому пробки должны быть достаточно плотными, с равномерным распределением волокон ваты. Плотные же пробки затрудняют снабжение культур воздухом. При разливе не допускается смачивание пробки питательной средой, так как пробка может прилипнуть к краям пробирки, стать более плотной, послужить субстратом для развития микроорганизмов.

Разлив в чашки Петри осуществляют с помощью стерильных бумажных фильтров с целью подсушивания сред и недопущения скапливания конденсата на крышке. Разлив осуществляют следующим образом: между крышкой и дном вставляют два бумажных фильтра, размер которых больше чашки, крышку снимают с верхним фильтром и ставят рядом на фильтр.

Нижнюю чашку заливают питательной средой так, чтобы она скрывала дно чашки (20 мл). Через фильтр лишняя влага испаряется, но он предохраняет среду от попадания микроорганизмов. Подсыхание питательной среды происходит в течение 2-4 ч. О готовности питательной среды судят по ребристой поверхности агара. Затем чашки закрывают, ставя крышку фильтра на фильтр нижней чашки, фильтры вынимают. Чашки с питательными средами хранят вверх дном, чтобы предотвратить высыхание питательной среды.

13.3 Картофельная среда для культивирования масляно-кислых бактерий

В небольшую колбу с высоким горлом вносят несколько кусочков нарезанного неочищенного картофеля (1/3 объема). На кожуре такого картофеля всегда имеются почвенные микроорганизмы – возбудители масляно-кислого брожения (род *Clostridium*). Колбу заливают водой на $\frac{3}{4}$ объема для создания анаэробных условий, добавляют 1-2 г мела и пастеризуют при 80 °C в течение 10

мин, чтобы погибли не образующие спор бактерии. Колбу помещают в термостат при 35 °С. Масляно-кислое брожение картофельного крахмала начинается через 1-2 суток, что можно определить по газообразованию и появлению неприятного запаха масляной кислоты. Через 2-3 суток картофель всплывает, если идет сильное газообразование. Это свидетельствует о наличии в колбе микроорганизмов, способных сбраживать крахмал, т.е. имеющих фермент амилазу. Микроскопировать каплю из полученной жидкости можно, добавив каплю раствора Люголя на предметное стекло с микроорганизмами, и закрыв их покровным стеклом. Характерным признаком масляно-кислых клостридий является наличие в их клетках гранулезы – крахмалоподобного вещества. Оно окрашивается раствором Люголя (йодом) в синий цвет. В микроскопическом препарате должны присутствовать крупные, раздутые споровые палочки с включениями гранулезы, окрашенными в синий цвет.

13.4 Среда Сабуро

Среда используется для контроля окружающей среды и для культивирования дрожжей, грибов и ацидофильных бактерий. Может быть жидкой и плотной.

Состав: Декстроза: 40, Бактериологический агар: 15, Смесь пептического перевара животной ткани и панкреатического гидролизата казеина (1:1): 10, pH: 5,6.

Готовая среда в виде порошка имеет следующий состав (в пересчете на 1 л готовой среды):

- Пептон ферментативный сухой – 7,0 г.
- Экстракт автолизированных дрожжей осветленный – 4,0 г.
- Агар микробиологический (для плотной среды) – 12,0 г.



Среда Сабуро агар

Жидкая или плотная питательная среда для культивирования дрожжей, плесени и ацидофильных бактерий, а также при санитарном обследовании объектов внешней среды.

Приготовление жидкой среды: 54 г сухой среды развести в 1 л воды очищенной, довести до кипения, кипятить 1-3 мин до полного растворения, охладить, откорректировать pH (5,5-5,7), разлить по 5 мл в стерильные пробирки. Стерилизовать в течение 20 мин при температуре 112 °С. Готовая среда должна быть прозрачной, светло-бежевого цвета. Готовую среду до использования можно хранить в темном месте не более 10 сут при температуре 2-8 °С.

Приготовление плотной среды: 66 г сухой среды развести в 1 л воды очищенной, довести до кипения, кипятить 1-3 мин до полного растворения, охладить, откорректировать pH (5,5-5,7). Снова довести до полного расплавления агара, при необходимости профильтровать через ватно-марлевый фильтр. Стерилизовать при температуре 112 °С в течение 20 мин. Среду охладить до температуры 50 °С, разлить в стерильные чашки Петри. Оставить чашки открытыми при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 1,5 часа в асептических условиях. Готовая среда должна быть прозрачной, светло-бежевого цвета. Готовую среду до использования можно хранить в темном месте не более 10 сут при температуре 2-8 °С. Посевы исследуемых образцов инкубировать 23-25 ч при температуре 37 °С.

Candida albicans дает на жидкой среде рыхлый осадок; на плотной среде – колонии белого цвета, гладкие с ровным краем диаметром 1-2 мм. Меры предосторожности при использовании по назначению готовых питательных сред – соблюдение требований СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и гельминтами и возбудителями паразитарных инфекций.



Среда Блаурокка

Утилизация сухих сред с истекшим сроком хранения и использованных готовых питательных сред – в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

13.5 Среда Блаурокка для бифидобактерий (печёчно-цистеиновая среда)

500 г говяжьей печени измельчают в мясорубке, заливают 1 л воды и кипятят 2 ч. Отфильтровывают остывшую среду и доводят до первоначального объема. Вносят 10 г пептона, 10 г лактозы, 100 мг хлористого цистеина, 5 г NaCl и агар, pH среды 6,8-7,0. Разливают в высокие пробирки.

При выращивании бифидобактерий на этой среде они бывают грамвариабельные (обычно грамположительные), слабее окрашиваются, появляется много гранулированных форм, клетки не выявляются.

13.6 Гидролизатно-молочная среда (ГМ-среда) для бифидобактерий

Расплавляют агар-агар в небольшом количестве гидролизата молока из расчета 2,5 г на 1 дм³ приготавливаемой среды. К остальному количеству гидролизата добавляют 20 г пептона, 3,5 г NaCl и нагревают до 80 °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. Устанавливают pH 7,5 и кипятят смесь 15 мин. После отстаивания сливают, освобождая от осадка, и к среде добавляют горячую дистиллированную воду до заданного объема, 10 г лактозы, 0,15 г соляно – кислого цистеина. Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 10 см³ и стерилизуют 30 мин при 112 °С.



ГМС - для учета бифидобактерий 100 г.

13.7 Селективная ацетатная среда (СЛ) по Rogosa для изоляции лактобактерий

Растворяют в 500 см³ дистиллированной воды пептон из казеина – 10,0 г; K₂HPO₄ – 6,0 г; диаммоний цитрат – 2,0 г; MgSO₄ x H₂O – 0,2 г, MnSO₄ x 4H₂O – 0,2 г; FeSO₄ x 7H₂O – 0,04; твин-80 – 1,0 г; глюкоза – 20,0 г; ацетат Na x 3H₂O – 25,0 г. Отдельно растворяют агар-агар на водяной бане – 15,0 г в 500 см³ дистил-

лированной воды, доводят первый раствор до pH до 5,4 кристаллической уксусной кислотой и добавляют его к расплавленному агару. Кипятят 5 мин. Не стерилизуют.

13.8 Среда для культивирования лактобацилл (Агар MRS)

Формула в граммах на литр. Декстроза 20,0. Бактериологический пептон 10,0. Мясной экстракт 8,0. Ацетат натрия 5,0. Дрожжевой экстракт 4,0. K_2HPO_4 2,0. Цитрат аммония 2,0. Твин-80 1,0. Сульфат магния 0,2. Сульфат марганца 0,05. Бактериологический агар 10,0. Конечная величина pH $6,2 \pm 0,2$ при 25 °С.

Приготовление. Развести 62 г среды в 1 литре дистиллированной воды. Хорошо перемешать и нагреть. Часто помешивая, довести до кипения. Кипятить в течение минуты до полного растворения. Разлить в емкости и стерилизовать 12 минут при 121 °С. Охладить до 45-50 °С, тщательно перемешать и разлить в чашки Петри. Готовая среда имеет янтарный цвет, слегка опалесцирует, должна храниться при температуре 8-15 °С.

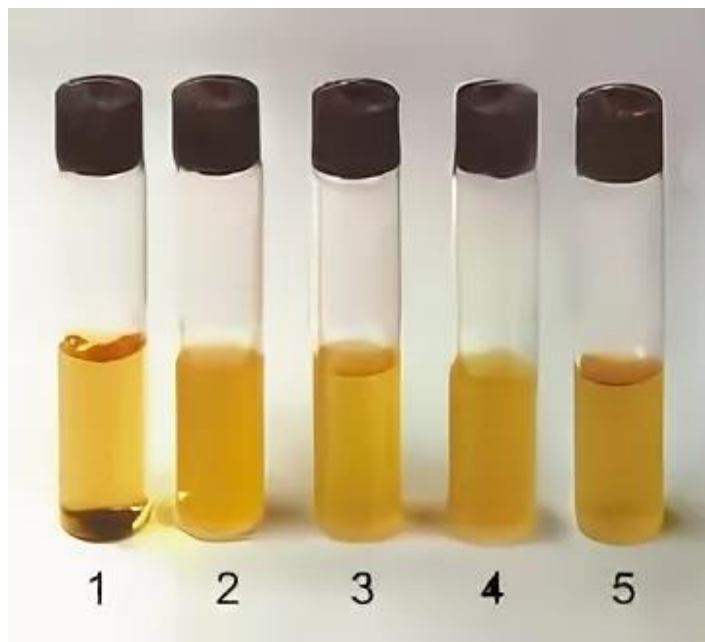
Использование. Состав агара MRS разработали де Ман, Рогоса и Шарпе (de Man, Rogosa and Sharpe) для получения среды, способной поддерживать хороший рост лактобацилл вообще и, в частности, таких штаммов, которые плохо растут на обычных средах, например, *L. brevis* и *L. fermenti*. Среда подходит для выращивания молочнокислых бактерий, в том числе *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Цитрат аммония при низких значениях pH ингибирует большинство микроорганизмов, допуская рост лактобацилл. K_2HPO_4 и ацетат натрия – буферные агенты для поддержания низкого значения pH; Твин 80 – эмульгатор; сульфаты марганца и магния – источники ионов и сульфата. Пептон, мясной и дрожжевой экстракты являются источниками питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот.



Среда для лактобацилл

Декстроза – ферментируемый углевод, являющийся источником углерода и энергии. При использовании метода глубинного посева необходимо налить в стерильную чашку Петри 1 мл пробы из соответствующего разведения, затем добавить охлажденную до 45-50 °С среду. После затвердевания наливается второй слой среды. Чашки инкубируются в 5% CO₂ при 35 °С в течение 3 суток или при 30 °С в течение 5 суток. Очень важно поддерживать влажную атмосферу, чтобы среда в чашках не высохла за время инкубации.

Лактобациллы – микроаэрофилы, и обычно для них требуется заливать чашки послойно для аэробного культивирования на твердых средах. Погруженные или поверхностные колонии могут быть компактными или перистыми, маленькими, матовыми, белыми. Рост некоторых штаммов лактобацилл ингибируется при уровне pH выше 6.0, поэтому среду необходимо закислять для поддержания роста. Для этого можно использовать несколько капель уксусной кислоты.



Lactobacillus MRA Broth (MRS Broth) (M369)

1. Control. 2. *Lactobacillus casei* ATCC 9595. 3. *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.
4. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. 5. *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338

Микробиологический тест. Следующие результаты были получены при использовании среды на тестовых культурах после инкубации в атмосфере, богатой CO₂, в течение 3-х дней при температуре 35 °С, либо в течение 5 дней при

30 °C. Рост *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 – Хороший; *Lactobacillus casei* ATCC 393 – Хороший; *Escherichia coli* ATCC 25922 – Умеренно хороший; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – Ингибируется.

13.9 Бульон MRS для лактобактерий, гранулированная форма

MRS среда готовится по прописи deMan, Rogosa и Sharpe с небольшой модификацией для поддержания обильного роста всех лактобацилл. Протеозопептон и мясной экстракт являются источником необходимых питательных веществ, глюкоза – ферментируемым субстратом и источником энергии. Дрожжевой экстракт обеспечивает витаминами группы В. Твин-80 – источник жирных кислот, необходимых для роста лактобактерий. Ацетат натрия и цитрат аммония подавляют рост стрептококков, плесневых грибов и многих других микроорганизмов.

Состав, грамм/литр: Протеозопептон 10,00; Мясной экстракт 10,00; Дрожжевой экстракт 5,00; Глюкоза 20,00; Твин-80 1,00; Аммония цитрат 2,00; Натрия ацетат 5,00; Магния сульфат 0,10; Марганца сульфат 0,05; Натрия гидрофосфат 2,00. Конечное значение pH (при 25 °C) $6,5 \pm 0,2$. Гранулированный светло-желтый порошок с высокой гигроскопичностью. Готовая среда янтарного цвета, прозрачная, слегка опалесцирует. Форма выпуска: непрозрачные водоотталкивающие пластиковые флаконы с навинчивающимся колпачком, который имеет внутреннюю крышку, не требующие дополнительного укупоривания. Порошок хранить при температуре ниже +8 °C, плотно закрытым. Готовую среду хранить при температуре +2-8 °C. На среде растут следующие виды лактобактерий – *Lactococcus casei*, *Lactococcus leichmanii*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus fermentum*.

13.10 Синтетическая среда с лизином для аспорогенных дрожжей

В 1 дм³ водопроводной воды последовательно растворяют глюкозу – 5,0 г, лизин – 3 г, КН₂ РО₄ – 1,0 г, MgSO₄ – 1,0 г, FeSO₄ – следы. Агар-агар виолет из расчета 1,5%, в расплавленном виде. Стерилизуют при 112 °C – 20 мин. Неспорообразующие дрожжи развиваются в виде крупных колоний. Не усваивающие лизин микроорганизмы растут в виде точечных колоний.

13.11 Дрожжевой автолизат

1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 дм³ воды и термостатируют при 55-58 °С 3 суток. Автоклавируют при 118 °С 15 мин, отфильтровывают и осадок промывают так, чтобы общее количество фильтрата составило 4 дм³. Фильтрат нейтрализуют 20%-м раствором NaOH до pH 6,8, разливают в пробирки и стерилизуют при 121 °С в течение 10 мин.



*Дрожжевой
экстракт НИЦФ*

13.12 Дрожжевой экстракт

100 г измельченных прессованных дрожжей заливают 500 см³ дистиллированной воды, кипятят при постоянном помешивании, пока не исчезнет пена. Оставляют в холодильнике на 24 ч. Полученную эмульсию фильтруют через вату и фильтрат стерилизуют при температуре 121 °С в течение 20 мин.

13.13 Молочная среда с полимиксином по Калине (для определения энтерококков)

На 100 см³ МПА (1,5%) добавляют глюкозы 1 г, дрожжевого экстракта – 2 см³. Стерилизуют 20 мин при 112 °С, pH – 6,0. Перед разливом в чашки Петри добавляют на 100 г среды – кристаллического фиолетового – 1,25 см³ в виде 0,01%-го водного раствора; сухого ТТХ (2,3,5-тридинилтетризолий хлорида) – 10 мг; стерильного обезжиренного молока – 10 см³; полимиксина – 200 ед/мл. Энтерококки, культивированные на этой среде при 37 °С, имеют округлые колонии диаметром 1,5-2 мм, с ровным краем, блестящей поверхностью, красноватой окраской, с зоной протеолиза на светло-голубом фоне.



*Молочно солевой агар
стафилококк*

13.14 МРС-агар или бульон для лактобактерий

Пептон из казеина 10,0 г, мясной экстракт – 10,0 г, дрожжевой экстракт – 5,0 г, глюкоза – 20,0 г, K₂HPO₄ – 5,0

г, диаммоний цитрат – 2,0 г, Na – 5,0 г, $MgSO_4 \times H_2O$ – 5,0 г, $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 0,2 г, твин-80 – 1,0 г, агар – 15,0 г, дистиллированная вода – до 1 л; pH 6,2-6,4. Стерилизация – 15 мин при 121 °С. Без добавления агара среда представляет собой бульон МРС.

13.15 Гидролизованное молоко для лактобактерий

Молоко (обычное или обезжиренное) кипятят и стерилизуют при 121 °С 15 мин, охлаждают до 45 °С. pH молока доводят до 7,6-7,8. В колбу с корковой пробкой вносят на 1 дм³ молока 0,5-1,0 порошка панкреатина (разведенного теплой водой), его можно заменить небольшим количеством мелкоизмельченной поджелудочной железы. К полученному составу добавляют 5 см³ хлороформа. Содержимое колбы энергично перемешивают, приоткрывая для удаления паров хлороформа. Оставляют в термостате при 40 °С на 18-24 ч. Полученное гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят в 2 раза водой, доводят pH до 7,0-7,2 и стерилизуют при 121 °С 15 мин.

13.16 Агар с гидролизированным молоком и мелом

Берут гидролизованное молоко, к которому добавляют 2% агара и 2-3% мела, предварительно хорошо измельченного. Стерилизуют 15 мин при 121 °С. Используют для количественного учета молочно-кислых бактерий в молоке и молочных продуктах.

13.17 Стерильное обезжиренное молоко

Молоко доводят до кипения, оставляют в холодильнике и через сутки снимают сливки. Обезжиренное молоко разливают в пробирки (на ½ от ёмкости), стерилизуют однократно при температуре 116 °С в течение 20 мин.

13.18 Среды Гисса

В составе сред индикатор – бромкрезоловый пурпурный, который реагирует на ферментацию углеводов изменением окраски с фиолетового на желтый. Если окраска остается фиолетовой, ферментация углерода не происходит.



Среда Гисса

Сахаролитические свойства, т.е. способность расщеплять сахар и многоатомные спирты с образованием кислоты или кислоты и газа чаще всего изучают на дифференциально-диагностических средах Гисса, которые содержат питательный агар, тот или иной углевод и индикатор Андрее (ВР или др.). В зависимости от изучаемого рода и вида бактерий подбирают среды с соответствующими моно- и дисахаридами (глюкоза, лактоза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.), в процессе ферментации которых образуются альдегиды, кислоты и газообразные продукты (CO_2 , H_2 , CH_4).

В состав короткого “пестрого” ряда Гисса входит 5 углеводов: глюкоза, лактоза, маннит, мальтоза и сахароза. При некоторых исследованиях для более углубленного изучения биохимических свойств выделенного микроорганизма ряд Гисса дополняют дульцитом, сорбитом, ксилозой, арабинозой и некоторыми другими сахарами. Название “пестрый” ряд обусловлено тем, что под действием ферментов микроорганизмов одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и соответственно цвет питательной среды. Пробирки выглядят «пестрыми». По консистенции среды Гисса бывают жидкими и полужидкими (с добавлением 0,2-0,5% агар-агара). В пробирки с жидкими средами Гисса для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, опускают “поплавок” – трубочку диаметром 0,5-0,7 см, запаиваемую с одного конца. “Поплавок” помещают запаиваемым концом кверху; при стерилизации он полностью заполняется питательной средой. При образовании в среде газообразных продуктов они вытесняют часть жидкости, находящейся в “поплавке”, вследствие чего у запаиваемого конца его собирается воздушный пузырек. В полужидких средах Гисса газообразование определяют по наличию мелких пузырьков газа в толще среды и стойкой пены на ее поверхности.

Таким образом, при изучении сахаролитических ферментов, выделяемых микробами, учитывают не только явления расщепления тех или иных сахаров по

кислотообразованию, но и глубину ферментативного процесса по наличию в питательной среде конечных газообразных продуктов. Пробирки с набором сред Гисса ставят в штатив в один ряд. На каждой пробирке надписывают название сахара, содержащегося в среде. На первой пробирке каждого ряда, кроме названия сахара, указывают номер или вид исследуемой микробной культуры. Культуру берут на кончик петли в очень небольшом количестве и засевают по общепринятой методике.

Критерии учета результатов:

- цвет среды не меняется – культура не ферментирует углевод;
- цвет среды изменяется (в случае использования индикатора Андрее – светло-желтого на красный, ВР – с розового на синий и т.д.) – культура ферментирует углевод с образованием кислых продуктов (органических кислот), пробирку отмечают буквой «К»;
- цвет среды изменяется и наблюдается появление пузырьков газа в среде или поплавке – культура ферментирует углевод с образованием кислых и газообразных продуктов. Такую пробирку отмечают буквами «КГ» +. Кроме того, сахаролитическую активность изучают на средах Эндо, Левина, Плоскирева. Микроорганизмы, сбраживая до кислоты находящийся в этой среде молочный сахар, образуют окрашенные колонии (кислота изменяет цвет индикатора). Колонии микробов, не ферментирующих лактозу, бесцветны.

13.19 Среда Левина

Среду используют для дифференциации шигелл от других кишечных бактерий. Среда содержит лактозу. Индикаторный комплект – эозин-метиленовый синий, окрашивает колонии в синий цвет, иногда в черный, если культура ферментирует лактозу. Микроорганизмы, не ферментирующие лактозу, растут в виде бесцветных колоний. Посевы культивируют при 37 °С 24 час., после чего оценивают результат. На среде возможно выделение коагулазоположительных стафилококков.

Состав среды Левина:

Лактоза – 10 г/л.

Пептон ферментативный – 10 г/л.

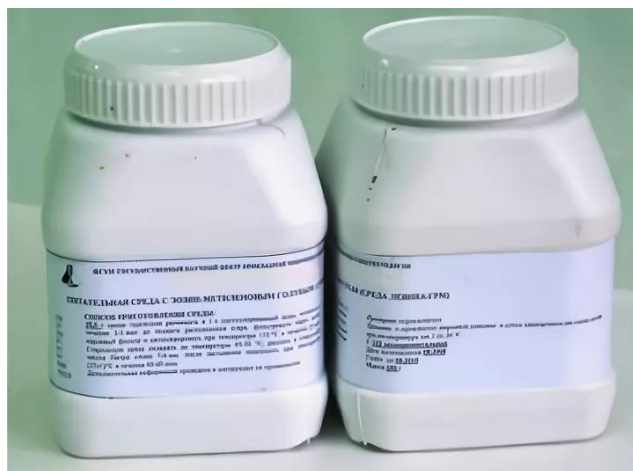
Агар микробиологический – 10 г/л.

Калия гидрофосфат – 1 г/л.

Натрия хлорид – 3,5 г/л.

Подготовка сухой питательной среды для использования. 50 г среды Левина размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 3 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватный фильтр разливают в стерильные бутылки и стерилизуют автоклавированием в течение 20 мин при температуре 112 °С. Среду после стерилизации охлаждают до температуры 45-50 °С, разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм.

После застывания среды, соблюдая правила асептики, чашки подсушивают в течение 40-60 мин при температуре (37±1) °С. Готовая среда может быть использована в течение 7 сут. При условии хранения при температуре 2-8 °С. Посев исследуемого материала проводят согласно «Методическим указаниям по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями» (1984) и регистрацию результатов анализа проводят визуально, по наличию роста колоний. Набор реагентов «Питательная среда с эозинметиленовым синим сухая (среда Левина)» должен обеспечивать на всех засеянных чашках рост тест-штаммов *Shigella flexneri* la 8516 и *Escherichia coli*



Питательная среда Левина

168/59 (O111:K58) при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведений 10^{-7} и 10^{-6} через 18-20 ч инкубации и тест-штамма *Staphylococcus aureus* 209-P при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-5} не позднее 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Колонии *S.flexneri* la 8516 должны быть бесцветными прозрачными круглыми диаметром 1,0-2,0 мм. Колонии *E.coli* 168/59 (O111:K58) – темно-фиолетовые с металлическим блеском (возможна слабая вы-

раженность металлического блеска) диаметром 1,5-2,5 мм. Колонии *S. aureus* 209-P – круглые, бесцветные или розоватого цвета диаметром до 1 мм.

Дифференцирующие свойства среды. Питательная среда Левина должна обеспечивать четкую дифференциацию по цвету колоний тест-штамма *S. Flexneri la 8516* от *E. Coli 168/59* (O111:K58) при посеве по 0,1 мл микробной смеси указанных тест-штаммов из разведения 10^{-6} через 18-20 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$.

13.20 Среда Плоскирева

Среда Плоскирева (Агар Сальмонелла Шигелла) предназначена для селективного выделения и дифференциации *Salmonella* и *Shigella* из клинических образцов (кал), также используется для исследования свежих и консервированных пищевых продуктов и фармацевтических продуктов на наличие сальмонелл.

Благодаря сильной ингибирующей способности Агар Сальмонелла Шигелла можно засевать штрихом большим количеством посевного материала, однако параллельно следует засевать штрихом другие, менее ингибирующие среды, такие как Агар с дезоксихолатом, Агар МакКонки, Агар XLD и Агар гектоеновый для энтеробактерий. Инокулировать и инкубировать 18-24 ч при $35\pm 2^\circ\text{C}$. Мясной экстракт и пептоновая смесь являются источниками питатель-



Среда Плоскирева

ных веществ, необходимых для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Лактоза – ферментируемый углевод, источник углерода и энергии. Смесь солей жирных кислот, цитрат натрия и бриллиантовый зеленый ингибирует грамположительные бактерии, большинство колиформных бактерий и бурный рост *Proteus spp.*, при этом допуская рост *Salmonella spp.* Нейтральный красный – индикатор pH. Тиосульфат натрия и цитрат железа способствуют обнаружению бактерий, выделяющих H_2S , таких как протеи и некоторые штаммы сальмонелл, которые образуют колонии с черным центром и светлым ореолом. Бактерии, не ферментирующие лактозу (предполагаемые па-

тогены), образуют светлые колонии, прозрачные или бесцветные, тогда как колиформы в достаточной мере ингибируются и образуют маленькие колонии цветом от розового до красного.

Высокоселективный состав данной среды не рекомендован для первичного выделения *Shigella spp.* Из-за возможного ингибирования некоторых видов. Среда соответствует рекомендациям европейской фармакопеи (среда K), стандартов USP. Согласно стандартам ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002), NF EN 12824, NF V 08-052, данная среда может использоваться для определения *Salmonella* в пищевых продуктах. Микроорганизмы, продуцирующие декарбоксилазу, образуют красные колонии (декарбоксилирование лизина).

Состав: Цитрат натрия: 8,5. Лактоза: 10. Мясной экстракт: 5,0. Цитрат железа: 1. Бриллиантовый зеленый: 0,0003. Бактериологический агар: 13,5. Смесь солей желчных кислот: 8,5. Тиосульфат натрия: 8,5. Пептоновая смесь: 5. Нейтральный красный: 0,025. pH: 7,0.

13.21 Агар гектоеновый

Среда для выделения и дифференциации грамотрицательных кишечных бактерий сальмонелл и шигелл. Формула в граммах на литр. Мясной пептон 12,0. Лактоза 12,0. Сахароза 12,0. Соли желчных кислот №3 – 9,0. Хлорид натрия 5,0. Тиосульфат натрия 5,0. Дрожжевой экстракт 3,0. Салицин 2,0. Цитрат аммонийного железа 1,5. Кислый фуксин 0,1. Бромтимоловый синий 0,064. Бактериологический агар 14,0. Конечная величина pH $7,5 \pm 0,2$ при 25 °C.

Приготовление. Развести 76 г среды в 1 литре дистиллированной воды. Тщательно перемешать и нагреть. Часто помешивая, довести до кипения. Кипятить в течение минуты до полного растворения. Не перегревать! Не автоклавировать! Охладить до 55-60 °C и разлить в чашки Петри. Готовая среда должна быть тускло-зеленого цвета и храниться при 8-15 °C.

Использование. Агар гектоеновый для энтеробактерий используется для выделения и дифференциации кишечных патогенов – сальмонелл, шигелл (воз-



Гектоеновый агар

будителей большого количества серьезных желудочно-кишечных инфекций) и других грамотрицательных энтеробактерий. Чаще всего среда используется в тех случаях, когда выделение возбудителей гастроэнтерита из пищевых продуктов включает много этапов.

Мясной пептон и дрожжевой экстракт являются источниками питательных веществ, необходимыми для роста микроорганизмов: азота, витаминов, минеральных солей и аминокислот. Повышенное содержание пептона и трех ферментируемых углеводов (лактозы, сахарозы и салицина) как источников углерода и энергии снижает ингибирующее действие солей желчных кислот на виды родов *Salmonella* и *Shigella*. Концентрация лактозы в этой среде выше, чем в других средах для кишечных бактерий. Это облегчает визуализацию и минимизирует проблему замедленной ферментации лактозы. Бромтимоловый синий и кислый фуксин – индикаторы pH. Тиосульфат натрия является источником серы, а цитрат аммонийного железа – индикатор образования H_2S . Сероводород-положительные колонии имеют черный центр. Хлорид натрия поддерживает осмотический баланс. Проба засеивается штрихом непосредственно на поверхность среды или с предварительным обогащением в Основе тетратионатного бульона, Бульоне селенит-цистиновом или Бульоне обогатительном для грамотрицательных бактерий и инкубируется 18-24 часа при 35 ± 2 °C. Рекомендуется высевать пробу одновременно на другие селективные среды для энтеробактерий, поскольку можно будет получить большое количество положительных культур. Это могут быть, например, Агар МакКонки, Агар Сальмонелла Шигелла. Агар с желчью и бриллиантовым зеленым, Агар дезоксихолат-лактозный Агар XLD. Несмотря на подавление роста, частично ингибируемые *E. coli* и другие организмы, которые утилизируют лактозу, сахарозу и/или салицин с выделением кислоты, образуют колонии, цвет которых варьирует от желтого до оранжевого и оранжево-розового. *Salmonella spp.* и *Shigella spp.* – зеленые или зелено-синие. *Proteus spp.* не ингибируются и образуют при росте зелено-желтые колонии. Колонии протеев и сальмонелл могут иметь черный центр и чистые края, если они образуют сульфид железа в результате выделения H_2S .

Микробиологический тест. Следующие результаты были получены при использовании среды на тестовых культурах после инкубации при температуре 35 ± 2 °C и наблюдались через 18-24 часа. Микроорганизмы:

- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, Частично ингибируется цвет Оранжевый.
- *Escherichia coli* ATCC 25922 Частично ингибируется Оранжевый цвет.
- *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Хороший рост Сине-зеленый цвет.
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Хороший рост Сине-зеленый с черным центром.
- *Shigella flexneri* ATCC 12022 Хороший рост Сине-зеленый.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 Ингибируется, роста нет.

13.22 Среда Макконки

А.Т. Макконки разработал первую хромогенную среду. В ее состав входят селективные компоненты (нейтральный красный и соли желчных кислот), которые ингибируют рост грамположительных микробов, и специфический субстрат – лактоза. Кишечные бактерии ферментируют лактозу, что приводит к понижению pH и изменению окраски pH-индикатора. В результате колонии сальмонелл, шигелл и колиформных бактерий имеют красный цвет и окружены мутной зоной преципитации желчных солей. Слово хромоген является комбинацией двух греческих слов: *chroma* (*chromatos*) – цвет и *genes* – порождающий. Принцип действия заключается в образовании окрашенных веществ (индикаторов) в результате взаимодействия высокоспецифичных ферментов бактерий с компонентами среды.

Плотные хромогенные питательные среды имеют значительные преимущества. Во-первых, идентификация возбудителя происходит одновременно с его выделением и не требует проведения предварительных посевов с целью получения чистой культуры.



Питательная среда
МАККОНКИ агар

Во-вторых, можно оценить спектр патогенов в пробе и их относительное количество.

В-третьих, требования к селективности ниже, что позволяет идентифицировать на них широкий спектр микроорганизмов, принадлежащих к разным родам и видам.

14. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Методов, используемых для идентификации микроорганизмов, много, но мы назовем лишь некоторые из них. Как правило, определение видов проводят в соответствии с ГОСТами (приложение 1). Микроорганизмы для их дальнейшей идентификации выделяют из воды, воздуха, силоса, навоза, почвы, разнообразных продуктов, молока и молочных продуктов, а также консервов. В основе определения видов лежат культурально-биохимические свойства и морфология микроорганизмов.

Параллельно с посевом на питательные среды готовят препараты из продукта для фазово-контрастного микроскопирования и (или) для окраски по Граму. Если жировые включения продукта затрудняют микроскопирование, то на неостывшее после фиксации предметное стекло наносят каплю ксилола и удаляют его немедленно фильтровальной бумагой.

В препаратах выявляют жизнеспособные и нежизнеспособные микробные клетки, устанавливают их морфологию и присутствие спор, подсчитывают число обнаруженных микроорганизмов в поле зрения микроскопа при увеличении: окуляр 10х и объектив 90х. В препарате просматривают не менее 10 полей зрения.

В случаях, предусмотренных требованиями нормативного документа, в каждой исследуемой упаковочной единице консервов определяют значение рН для выявления возможного прокисания продукта.

14.1 Выявление и определение количества плесневых грибов и дрожжей

Для выявления и определения количества плесневых грибов и дрожжей по $1,0 \pm 0,1$ г или $1,0 \pm 0,1$ см³ консервированного продукта вносят параллельно в две чашки Петри, которые заливают одной из агаризованных питательных сред, указанных в ГОСТ 10444.12-2013.

Выявление плесневых грибов и дрожжей проводят путем посева продукта параллельно в две пробирки с 5-6 см³ жидкого солодового сусли или среды Са-

буро. Посевы термостатируют при температуре 24 ± 1 °С. Через 3 суток проводят предварительный учет типичных колоний или появления характерных признаков роста на жидких средах.

Если в посевах на агаризованных средах присутствуют мукоровые быстро растущие грибы, то при предварительном количественном подсчете типичных колоний необходимо чашки Петри переворачивать очень осторожно, не допуская того, чтобы споры этих грибов осыпались и дали рост вторичных колоний. Через 5 суток проводят окончательный учет результатов термостатирования посевов.

14.2 Выявление молочно-кислых микроорганизмов

Для выявления молочнокислых микроорганизмов по $1,0 \pm 0,1$ г или $1,0 \pm 0,1$ см³ консервированного продукта вносят параллельно в две пробирки с жидкой питательной средой или в чашки Петри, которые заливают агаризованной средой.

Перечень используемых для выявления молочно – кислых микроорганизмов питательных сред, их состав и приготовление приведены в ГОСТ 10444.11-2012.

Посевы термостатируют при температуре 30 ± 1 °С не более 5 суток или при температуре 37 ± 1 °С не более 3 суток.

Принадлежность к молочно – кислым микроорганизмам устанавливают по ГОСТ 10444.11-2012 по культуральным признакам развития, морфологии клеток, по положительной окраске по Граму, отсутствию каталазы.

14.3 Выявление бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в пастеризованных продуктах

Подготовленный продукт для выявления колиформных бактерий высевают в количестве: трех объемов по 100 см³, трёх объемов по 10 см³ и трех объемов по 1 см³. Каждый объем по 100 см³ и 10 см³ высевают соответственно в такое же количество одной из питательных сред двойной концентрации, а каждый объем по 1 см³ – в 10 см³ среды нормальной концентрации.

Перечень питательных сред для выявления колиформных бактерий, их состав и приготовление приведены в соответствующих нормативных документах.

Объемы продукта 100 и 10 см³ можно высевать соответственно в 10 и 1 см³ концентрированной лактозо-пептонной среды, а 1 см³ – в 10 см³ лактозо-пептонной среды нормальной концентрации. Лактозо-пептонную среду концентрированную и нормальной концентрации готовят по ГОСТ 18963-73.

Если продукта из одной упаковочной единицы недостаточно для определения микробиологических показателей, то объединяют две или более единицы в одну. Термостатирование посевов, пересевы на среду Эндо для выделения чистой культуры, подтверждение принадлежности выросших микроорганизмов к колиформным бактериям проводят по соответствующему нормативному документу.

14.4 Метод определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Настоящий метод распространяется на пищевые продукты, содержащие в 1 г 300 и более или в 1 мл 30 и более микроорганизмов, и устанавливает порядок определения жизнеспособных клеток мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в агаризованную питательную среду, культивировании посевов в аэробных условиях при 30 °С в течение 72 ч, подсчете всех выросших видимых колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и пересчете их количества на 1 г (мл) продукта.

Масса (объем) навески, предназначенной для приготовления исходного разведения, должна составлять не менее 10 г (мл), а предназначенной для непосредственного посева в питательные среды – не менее 1 г (мл).

Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений. По 1 мл продукта и/или его разведений высевают одновременно в две стерильные чашки Петри. В каждую чашку Петри, содержащую инокулум, добавляют не позднее чем через 15 мин расплавленную и охлажденную до 45 °С плотную

питательную среду. Среду немедленно и равномерно перемешивают с посевным материалом и оставляют для застывания в горизонтальном положении.

После застывания агаризованной среды посеvy инкубируют, поставив чашки дном вверх, при 30 °С в течение 72 ч.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. На чашках, где выросло от 30 до 300 колоний, подсчитывают все колонии, суммируют и находят среднее арифметическое. Подсчитать колонии можно с помощью лупы с пятикратным увеличением. Полученное среднее арифметическое числа колоний округляют:

- если меньше 100, его округляют до ближайшего числа, делящегося на 5;
- если больше 100 и его последняя цифра 5, округляют до ближайшего числа, делящегося на 20;
- если больше 100 и его последняя цифра не 5, округляют до ближайшего числа, делящегося на 10.

Количество микроорганизмов в 1 г (мл) продукта вычисляют умножением округленного среднего арифметического числа колоний на разведение навески и делением на количество вносимого посевного материала (масса, объем) в чашку. Например, округленное среднее арифметическое числа колоний с двух чашек, засеянных по 1 мл из 10 разведений, равнялось 220. Общее количество микроорганизмов в 1 г продукта будет равно:

$$\frac{220 \cdot 1\,000}{1} = 220\,000.$$

Общее количество микроорганизмов записывают в виде числа: (от 1 до 9,9) · 10. Например, 220 000 клеток в 1 г записывают как 2,2 · 10⁵ КОЕ/г.

15. ОБЯЗАННОСТИ И ПРАВА ЛАБОРАНТА ЛАБОРАТОРИИ

Должностные обязанности

1. Качественно мыть химическую и микробиологическую, готовить чистую посуду для проведения анализов.
2. Стирать спецодежду, халаты, полотенца, шторы, салфетки и т.д.
3. Поддерживать в надлежащем санитарном состоянии помещение кафедры, оборудование, мебель, рабочие столы студентов.
4. Следить за состоянием досок в аудиториях, растениями и т.д.
5. Принимать участие в ремонте аудиторий кафедры и подготовке их к новому учебному году.
6. Строго соблюдать правила работы в микробиологической лаборатории и технику безопасности.
7. Выполнять работы по подготовке к занятиям необходимого оборудования (микроскопы, термостаты и пр.), питательных сред, красителей, стерильной посуды, салфеток, бумаги, игл, бактериальных петель и пр.
8. Выдает студентам под документ и получает от них оборудование лаборатории и учебные пособия.
9. Следит за соблюдением студентами правил внутреннего распорядка в микробиологической лаборатории, техники безопасности и исправности противопожарной техники. Следит за сохранностью и исправностью оборудования.
10. Принимает участие в изготовлении и оформлении наглядных пособий, методических указаний, лекционных демонстраций.
11. Принимает участие в монтаже оборудования под руководством ведущей лабораторией.
12. Помогает преподавателю в проведении занятий, обеспечивает исправность стендов и оформление аудитории.
13. Ведет журнал по технике безопасности.

14. Постоянно повышает свой теоретический и профессиональный уровень, осваивает новые методы работы.

15. Проводит несложную экспериментальную работу под руководством заведующего кафедрой или преподавателя. Принимает участие в аналитической работе.

16. Отвечает за готовность аудитории к занятиям в текущем году и за готовность к новому учебному году. Участвует в ремонте аудиторий кафедры.

17. Следит за работой дистиллятора и наличием дистиллированной воды для анализа.

18. Следит за чистотой культур микроорганизмов и химических реактивов, используемых в лаборатории.

19. Отвечает за своевременное выполнение поручений заведующего кафедрой и заведующей лабораторией.

Права

1. Лаборант имеет право требовать от студентов и посетителей соблюдения правил внутреннего распорядка.

2. Не допускать в аудиторию в верхней одежде не только студентов, но и посторонних посетителей, выходя для беседы с ними в коридор или вызывая для этого преподавателей.

3. Запрещает эксплуатацию оборудования, состояние которого требует ремонта или угрожает безопасности людей.

4. Доводит до сведения заведующей лабораторией и заведующего кафедрой случаи нарушения порядка и принимает меры по их устранению.

5. Имеет право на сокращенный рабочий день.

6. Вносить предложения по улучшению лабораторной работы по микробиологии и зоогигиене.

7. Помогает в организации студенческих олимпиад, проводимых кафедрой.

16. ОБЯЗАННОСТИ И ПРАВА ЗАВЕДУЮЩЕЙ ЛАБОРАТОРИЕЙ

Обязанности

1. Заведующая лабораторией является материально-ответственным лицом кафедры и непосредственным исполнителем работ по материально-техническому обеспечению лаборатории.

2. Ведет учет расходов и новых поступлений в лабораторию, выдает сотрудникам оборудование, посуду, реактивы с соответствующей записью.

3. Приобретает и получает со склада необходимые материалы, реактивы, оборудование, составляет заявки на материалы, оборудование, спирт и подает их по назначению в установленные сроки.

4. Обеспечивает сохранность и исправность инвентаря и оборудования, ведет учет всех материальных ценностей, находящихся на кафедре.

5. Следит за табличным фондом кафедры, организует изготовление таблиц и других наглядных пособий.

6. Ведет регистрацию контрольных и курсовых работ студентов, поступающих на кафедру.

7. Своевременно вручает исполнителям приказы и распоряжения ректора, декана, а также другие документы, поступающие на кафедру.

8. Участвует в подготовке плана работы, отчетов кафедры и всей документации к началу нового учебного года, размножает необходимые для занятий документы, методические пособия.

9. При отсутствии лаборанта кафедры выдает студентам и получает от них лабораторное оборудование и учебные пособия. Готовит к лекциям и занятиям наглядные пособия и приборы.

10. Участвует в организации кафедральных, внутриинститутских, межинститутских студенческих олимпиад.

11. Обеспечивает нормальную работу технических средств в ходе учебного процесса.

12. Отвечает за состояние техники безопасности по всем аудиториям на кафедре и за противопожарное состояние, следит за соблюдением чистоты в аудиториях.

13. Соблюдает правила внутреннего распорядка и дисциплины труда.

14. Организует работу и осуществляет контроль за подготовкой учебных аудиторий, оборудования, биологического материала, реактивов к проведению занятий преподавателями кафедры.

15. Принимает участие в проведении полевых и лабораторных научных исследований в соответствии с установленной методикой, планом и программой кафедры.

16. Ведет учет и представляет акты на списание использованных химических препаратов, материалов и вышедшего из строя оборудования, и имущества.

17. Заведующая лабораторией повышает свой теоретический уровень, чтобы стать квалифицированным микробиологом.

18. Организует ремонт аудиторного фонда кафедры к новому учебному году.

19. Подчиняется заведующему кафедрой, который осуществляет методическое и научное руководство.

20. Соблюдает правила внутреннего распорядка и дисциплины труда.

21. Пересевает музейную коллекцию микроорганизмов и хранит один экземпляр в сейфе и один в холодильнике.

Права

1. Заведующая лабораторией имеет право вносить предложения заведующему кафедрой по улучшению работы кафедрального оборудования, организации аналитических работ и условий труда, повышению сохранности материальных ценностей.

2. Давать указания лаборанту по ходу работы, контролировать его работу, требовать исправления допущенных ошибок, согласовывая это с заведующим кафедрой.

3. Имеет право на продолжительность рабочего времени не более 36 ч в неделю в силу вредных условий труда.

4. Обращаться за консультациями по организационным и методическим вопросам к заведующему кафедрой.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Микробиология: учебник / О.Д. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова, Л.И. Войно. – Москва: ИНФРА-М, 2024. – 286 с. – (ВО). – ISBN 978-5-16-018764-8. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/2055768> (ЭБС ИНФРА-М)
2. Пономарева, М.С. Микробиология: руководство к лабораторным занятиям: учебно-методическое пособие / М.С. Пономарева, Л.Н. Шабурова, Н.Г. Ильяшенко, М.В. Гернет. – Москва: ИНФРА-М, 2021. – 246 с.: ил. – (ВО: Бакалавриат, Магистратура). – ISBN 978-5-16-017113-5. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1764800> (ЭБС ИНФРА-М)
3. Гернет, М.В. Микробиология: учебник / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова, М.В. Гернет. – Москва: ИНФРА-М, 2021. – 263 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс]. – (СПО). – ISBN 978-5-16-016454-0. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1150324> (ЭБС ИНФРА-М)
4. Кисленко, В.Н. Микробиология. Практикум: учебное пособие / В.Н. Кисленко. – Москва: ИНФРА-М, 2021. – 239 с. – (ВО: Бакалавриат). – DOI 10.12737/1016621. – ISBN 978-5-16-015071-0. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1505323> (ЭБС ИНФРА-М)
5. Ильяшенко, Н.Г. Микроорганизмы и окружающая среда: учебное пособие / Н.Г. Ильяшенко, Л.Н. Шабурова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: ИНФРА-М, 2023. – 195 с. – (ВО). – DOI 10.12737/25060. – ISBN 978-5-16-018530-9. – Текст: электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/1995360> (ЭБС ИНФРА-М)

**ГОСТы, наиболее часто используемые при изучении
дисциплины «Микробиология»**

1. ГОСТ 10444.1-84. Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе.

2. ГОСТ 10444.8-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *Bacillus cereus*. Метод подсчета колоний при температуре 30 °C (ISO 7932:2004, MOD.

3. ГОСТ 10444.9-88. Продукты пищевые. Метод определения *Clostridium perfringens*.

4. ГОСТ 10444.12-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов.

5. ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа: межгосударственный стандарт.

6. ГОСТ 21237-75. Мясо. Методы бактериологического анализа: межгосударственный стандарт.

7. ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.

8. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов: межгосударственный стандарт.

9. 12. ГОСТ 28566-90. Продукты пищевые. Метод выявления и определения количества энтерококков.

10. ГОСТ 31747-2012. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) ((ISO 4831:2006, MOD; (ISO 4832:2006, MOD.

11. ГОСТ 31904-2012. Продукты пищевые. Методы отбора проб для мик-

робиологических испытаний.

12. ГОСТ 32901-2014. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа.

13. ГОСТ 33951-2016. Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов.

14. ГОСТ Р 54354-2011. Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа: национальный стандарт РФ: введен впервые.

15. ГОСТ 7702.2.0-2016. Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям.

16. ГОСТ 7702.2.7-2013. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления бактерий рода *Proteus*.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ВИДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ.....	4
2. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ.....	7
2.1 Требования к учебной микробиологической лаборатории.....	8
2.2 Оборудование учебной микробиологической лаборатории.....	9
2.3 Особенности организации вирусологической лаборатории.....	12
3. ПРАВИЛА РАБОТЫ В УЧЕБНОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	18
4. ПРИЕМЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ.....	20
4.1 Виды дезинфекции.....	20
4.2 Средства дезинфекции.....	23
4.3 Приготовление дезинфицирующих растворов.....	27
5. МЫТЬЕ НОВОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ.....	30
6. МЫТЬЕ ПОСУДЫ, БЫВШЕЙ В УПОТРЕБЛЕНИИ.....	32
7. СУШКА И ХРАНЕНИЕ ЧИСТОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОСУДЫ.....	34
8. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПОСУДЫ И ИНСТРУМЕНТОВ.....	35
8.1 Стерилизация сухим жаром в сушильном шкафу (печи Пастера)....	37
8.2 Стерилизация кипячением.....	37
8.3 Стерилизация насыщенным паром под давлением (в автоклаве)....	39
8.4 Электронно-лучевое излучение как метод обработки с целью уничтожения микроорганизмов в продуктах (один из видов стерилизации).....	45
8.5 Гамма-стерилизация для увеличения срока хранения продуктов.....	46
9. РАБОТА С ПРИБОРАМИ В ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ.....	48
9.1 Правила работы с термостатом.....	48
9.2 Правила работы с водяной баней.....	49
9.3 Правила работы с облучателями.....	49
9.4 Безопасная эксплуатация боксов биологической безопасности.....	50
10. ПРАВИЛА РАБОТЫ С КОЛЛЕКЦИЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	53
11. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ХИМИЧЕСКИМИ РЕАКТИВАМИ.....	55
11.1 Виды химических реактивов.....	55
11.2 Правила обращения с химическими реактивами.....	55
12. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОКРАШИВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	57
12.1 Красители и реактивы для окраски по Граму.....	57
12.2 Красители и реактивы для окраски кислотоустойчивых бактерий.....	58
12.3 Реактивы для окрашивания спор бактерий.....	58
12.4 Окраска капсул по методу Бури.....	59
13. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	60
13.1. Использование сухих питательных сред.....	60

13.2. Приготовление синтетических питательных сред.....	61
13.3. Картофельная среда для культивирования масляно-кислых бактерий.....	64
13.4 Среда Сабуро.....	65
13.5 Среда Блаурокка для бифидобактерий (печеночно-цистеиновая среда).....	67
13.6 Гидролизатно-молочная среда (ГМ-среда) для бифидобактерий..	67
13.7 Селективная ацетатная среда (СЛ) по Rogosa для изоляции лактобактерий.....	67
13.8 Среда для культивирования лактобацилл (Агар MRS).....	68
13.9 Бульон MRS для лактобактерий, гранулированная форма.....	70
13.10 Синтетическая среда с лизином для аспорогенных дрожжей.....	70
13.11 Дрожжевой автолизат.....	71
13.12 Дрожжевой экстракт.....	71
13.13 Молочная среда с полимиксином по Калине (для определения энтерококков).....	71
13.14 МРС-агар или бульон для лактобактерий.....	71
13.15 Гидролизованное молоко для лактобактерий.....	72
13.16 Агар с гидролизованным молоком и мелом.....	72
13.17 Стерильное обезжиренное молоко.....	72
13.18 Среды Гисса.....	72
13.19 Среда Левина.....	74
13.20. Среда Плоскирева.....	76
13.21 Агар гектоеновый.....	77
13.22 Среда Макконки.....	79
14. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ.....	81
14.1 Выявление и определение количества плесневых грибов и дрожжей.....	81
14.2 Выявление молочно-кислых микроорганизмов.....	82
14.3 Выявление бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в пастеризованных продуктах.....	82
14.4 Метод определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАиМ).....	83
15. ОБЯЗАННОСТИ И ПРАВА ЛАБОРАНТА ЛАБОРАТОРИИ.....	85
16. ОБЯЗАННОСТИ И ПРАВА ЗАВЕДУЮЩЕЙ ЛАБОРАТОРИЕЙ.....	87
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	90
Приложение. ГОСТы, наиболее часто используемые при изучении дисциплины «Микробиология».....	91

Литвина Лидия Алексеевна,
Горских Валерий Гаррьевич,
Анфилофьева Ирина Юрьевна

Особенности работы в учебной микробиологической лаборатории

Учебно-методическое пособие

Печатается в авторской редакции
Оператор электронной верстки Н.Е. Карачева

Подписано в печать _____ г.
Формат 60×84 1 /16. Объем ____ уч.-изд. л., 5,9 усл. печ. л.
Тираж ____ экз. Изд.№ ____ . Заказ № ____ .

Отпечатано в Издательском центре «Золотой колос»
630039, РФ, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, офис 106
Тел. факс (383) 267-09-10. E-mail: 2134539@mail.ru