

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

И. И. КОНЦЕВАЯ

**Микробиология:
культивирование и рост бактерий**

**Практическое руководство
для студентов специальности 1-31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

Чернигов
Издательство «Десна Полиграф»
2017

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73
К653

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент И.В. Вуевская;
кандидат химических наук, доцент С.М. Пантелеева

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Концевая, И. И.

К653 Микробиология: культивирование и рост бактерий.
Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов /
И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т
им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.

Практическое руководство ставит своей целью оптимизировать учебно-познавательную деятельность студентов по усвоению материала раздела «Культивирование и рост бактерий». Последовательно рассматриваются основные принципы и методы культивирования микроорганизмов. Оно может быть использовано как на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Микробиология», так и для самостоятельной подготовки.

Адресовано студентам биологического факультета.

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73

© Концевая И. И., 2017
© УО «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины», 2017

Содержание

Введение.....	4
Занятие 1 Питательные среды: состав, назначение, техника приготовления	5
Занятие 2 Способы культивирования микроорганизмов.....	13
Занятие 3 Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха	20
Занятие 4 Выделение чистых культур микроорганизмов	30
Литература.....	40

Введение

Задача курса «Микробиология» состоит в широком ознакомлении с микроорганизмами и, в частности, с бактериями. Знание микробиологии необходимо для формирования мировоззрения об огромной роли микроорганизмов в природе и в жизни человека.

На лабораторных занятиях по разделу «Культивирование и рост бактерий» студенты знакомятся с требованиями к питательным средам; основными типами питательных сред; методами культивирования аэробных, анаэробных и фотосинтезирующих микроорганизмов в лабораторных условиях; методами обнаружения и выделения микроорганизмов из природных субстратов. Материал руководства дает представление о накопительных культурах и принципе селективности, о методах получения чистых культур, и проведении качественного и количественного анализа микрофлоры.

Материал каждого занятия начинается с плана, включает изложение теоретической части и вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля. Далее перечисляются материалы и оборудование, необходимые на занятии, ставится цель занятия, перечисляются задания для самостоятельной работы студентов на лабораторном занятии. Результаты наблюдений морфологических особенностей микроорганизмов студенты оформляют в виде таблиц, представленных в руководстве.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса. Студенты, отработавшие лабораторные занятия, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследований.

Целью практического руководства является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами микробиологии и выработке практических навыков работы с культурами микроорганизмов. Материал пособия делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества.

Практическое пособие адресовано студентам специальности 1–31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Занятие 1

Питательные среды: состав, назначение, техника приготовления

- 1 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу
- 2 Классификация питательных сред
- 3 Приготовление питательных сред
- 4 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике

1 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу

Потребности микроорганизмов в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма.

В широком смысле слова питательная среда должна соответствовать следующим требованиям:

Во-первых, питательная среда должна включать доступный для клетки *источник энергии*. Для одних организмов (фототрофов) таким источником служит свет, для других – органический (хемоорганотрофы) или неорганический (хемолитотрофы) субстрат.

Во-вторых, среда должна содержать все необходимые *компоненты для биосинтетических процессов* в клетке. Причем синтетические способности микроорганизмов могут варьировать от использования углекислого газа в качестве единственного источника углерода (автотрофы) до потребности в более восстановленных соединениях углерода – кислотах, спиртах, углеводах и др. (гетеротрофы).

В узком смысле слова любая искусственная питательная среда должна соответствовать следующим требованиям: содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме; иметь оптимальную влажность, вязкость, рН, быть изотоничной, сбалансированной с высокой буферной емкостью и, по возможности, прозрачной.

Питательной средой в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Еще в 1930 году их было классифицировано не менее двух тысяч, но число ингредиентов, являющихся их неотъемлемыми компонентами, относительно невелико, а их

композиции создаются на определенных общих принципах. Для размножения любых бактерий необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и биохимические питательные компоненты.

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Например, бактерии рода *Nitrobacter* ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO_2 , органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *E.coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются **факторами роста**.

2 Классификация питательных сред

Выбор питательной среды зависит в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их следующих особенностей.

По составу питательные среды делятся на натуральные и синтетические.

Натуральными называют среды, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения, имеющих **неопределенный химический состав**. Примерами питательных сред такого типа являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, мышц млекопитающих), образующихся при их гидролизе. Кислотный (HCl) гидролиз белков используется для приготовления полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина, панкреатина, папаина приводит к неполному гидролизу белков, в результате чего образуются **пептоны**. Как правило, на пептонных питательных средах микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов или смесей аминокислот. При ферментативном гидролизе, вероятно, сохраняются лабильные факторы роста. Кроме того, многие микроорганизмы лучше размножаются на средах, содержащих

небольшие пептиды, потому что их они могут усваивать непосредственно, а отсутствующие аминокислоты – нет.

К питательным средам неопределенного состава можно отнести и среды, полученные на основе растительного сырья: картофельный агар, томатный агар, отвары злаков, дрожжей, пивное сусло, настои сена и др. К числу сред неопределенного состава относят и среды **полусинтетические**. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; а также добавляют небольшое количество дрожжевого или кукурузного экстракта (или любого другого природного продукта) для обеспечения неизвестных потребностей роста. **Основное назначение** таких питательных сред – выделение, культивирование, получение биомассы и поддержание культур микроорганизмов.

Синтетические среды – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Обязательными компонентами таких сред являются неорганические соли и углерод- и азотсодержащие вещества (типичными представителями являются глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. Ауксотрофные организмы растут на таких средах только при добавлении соответствующих факторов роста. **Основное назначение** таких питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетических рекомбинантов и т. д.

По назначению среды разделяют на **основные**, **элективные** и **дифференциально-диагностические**.

К **основным** относятся среды, применяемые для выращивания многих бактерий. Например, это триптические гидролизаты рыбных продуктов или казеина, из которых готовят жидкую среду (питательный бульон) и плотную (питательный агар). К ним относят и мясо-пептонный агар (МПА), который применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, и солодовый агар (СА) – применяют для культивирования дрожжей и плесневых грибов. Такие среды служат основой для приготовления более сложных питательных сред. В качестве **основных** иногда используют синтетические питательные среды, к которым добавляют аминокислоты, витамины, пептон, дрожжевой экстракт и т.д.

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для преимущественного выделения грамотрицательных бактерий бывает достаточным добавления в питательную среду

трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый и т. д.). Для выделения стафилококков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т. е. при получении накопительной культуры.

Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и т.д. Принцип построения таких сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды.

В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма.

Например, среда Левина в качестве индикаторов содержит эозин и метиленовый синий, исходно окрашена в черно-синий цвет. Клетки, осуществляющие брожение, образуют колонии, окрашенные в черный с металлическим блеском цвет, а колонии, не обладающие этим свойством, бесцветны. Данная среда позволяет отличать бактерии рода *Escherichia* от бактерий рода *Proteus*. Для этой же цели на практике часто используют среду Эндо.

По консистенции среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими.

3 Приготовление питательных сред

Жидкие питательные среды получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими.

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии со времен Р. Коха. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать

микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции.

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатина, силикагель, каррагенан.

Наиболее распространенным из уплотнителей является *агар* – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей и состоящий из двух полисахаридов – агарозы (70 %) и агаропектина. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов многих видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности; 6) наиболее часто используемые концентрации 1,5–2,0 % являются относительно невысокими и их применение относительно экономично.

Желатина – белок, приготовленный из кожи и костей. «Уплотняющая» концентрация желатины – 17–20 %. Используется для специальных целей, поскольку образуемый ею гель плавится при температурах около 30 °С. Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов.

Силикагелем называют двуокись кремния (SiO₂). Среда на основе силикагеля (1,5–2,0 %) используют для получения культур автотофных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества. С помощью силикагелиевых сред также можно определять потребности бактерий в витаминах.

Каррагенан («растительная желатина») – добывается путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Каррагенан дешевле агара, используется в концентрации 2 %, не разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре – 55–60 °С.

Полужидкие среды содержат гелеобразующее вещество в низкой (0,3–0,7 %) концентрации и имеют мягкую желеподобную консистенцию. Такие среды пригодны для изучения подвижности и хемотаксиса клеток, культивирования микроаэрофилов.

Сыпучие среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного сырья (чаще всего растительного). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или водки), сельском хозяйстве (силосование кормов, выращивании грибов) и т. д.

Определение состава питательной среды предполагает, что при этом будут учтены и такие биофизические факторы как рН среды, температура, подача и удаление молекулярного кислорода, являющимися критическими для роста любой бактериальной культуры.

4 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике

В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые получают в промышленных масштабах – триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука, технический казеин) и питательный агар. Сухие среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и приготовлении, имеют относительно стандартный состав.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Определите понятие «питательные среды».
- 2 Какие требования предъявляют к составу питательных сред?
- 3 Поясните на примерах классификацию питательных сред.
- 4 Какие вещества используются для получения твердых сред?
- 5 Почему агар является наиболее используемым уплотнителем при приготовлении плотных сред?
- 6 Перечислите наиболее распространенные питательные среды в бактериологической практике, охарактеризуйте их.

Практическое занятие 1

Цель: ознакомление с наиболее часто употребляемыми питательными средами, их составом, назначением, техникой приготовления.

Оборудование и материалы: дистиллированная вода, электрическая плитка, мерные цилиндры, весы, шпатель, стерильные колбы на 250 мл с ватными пробками, хозяйственная рукавица, сухие питательные среды разного состава, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички, чашки Петри с питательной средой.

Ход работы

1 Изучить составы ниже приведенных питательных сред, записать в рабочую тетрадь название сред и их составы. Охарактеризовать каждую из них согласно классификации: по составу, назначению, консистенции; указать условия культивирования микроорганизмов на каждой из сред?

Среда 1, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, pH – 7,2.

Среда 2, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, глюкоза – 10, цистеин – 0,01, агар – 15, pH – 7,2.

Среда 3. Среда М 9 (основа для культивирования почвенных бактерий), (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, pH – 7,2.

Среда 4, (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, pH – 7,2.

Среда 5, (г/л): пептон – 5, мясной экстракт – 5, бромкрезоловый пурпурный 1,6% раствора – 0,625 мл, крезоловый красный 0,2% раствора – 2,5 мл, глюкоза – 0,5 г, пиридоксаль – 0,5, pH среды – 6,0.

Среда 6. Среда Эшби (концентрированная) для культивирования азотфиксирующих микроорганизмов, (г/л): KH_2PO_4 – 2, NaCl – 2, K_2SO_4 – 1, MgSO_4 – 2, CaCO_3 (мел) – 50, маннит – 200, pH – 7,2.

Среда 7. Мясопептонный бульон (для культивирования широкого круга микроорганизмов), (г/л): мясная вода, NaCl – 0,5 %.

Среда 8. Картофельная среда (в основном для культивирования спорообразующих бактерий), (г/л): картофель, мел – на кончике ножа.

Среда 9. Среда (для выделения актиномицетов), (г/л): крахмал растворимый – 20, KNO_3 – 1, K_2HPO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, NaCl – 0,5, FeSO_4 – следы, вода водопроводная, pH 7,2–7,3.

Среда 10. Для выделения культур *Clostridium*, (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, вода водопроводная, глюкоза – 20, пептон – 5, CaCO_3 – 10, pH – 7,0.

Среда 11. Для выделения микроорганизмов, растворяющих фосфаты кальция, (г/л): глюкоза – 10, аспарагин – 1, K_2SO_4 – 0,2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, дрожжевой экстракт – 0,02, агар – 15, вода водопроводная.

Среда 12. Выделение культур микобактерий, (г/л): NH_4Cl – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,2, CaCO_3 – 0,2, вода водопроводная.

Среда 13. Выделение культур лактобацилл, (г/л): гидролизат казеина – 10, мясной экстракт – 10, дрожжевой экстракт – 5, глюкоза – 20, ацетат натрия – 5, цитрат аммония – 2, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4$ – 0,2, $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,05, вода дистиллированная.

Среда 14. среда Гиса, (г/л): пептон – 10, NaCl – 5, K_2HPO_4 – 10, индикатор Андрее – 1% или бромкрезоловый пурпурный – 1,6%, агар – 5, вода дистиллированная, pH – 7,2.

Среда 15, (г/л): $Na_2 HPO_4$ – 24, $KH_2 PO_4$ – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, агар – 20, pH – 7,2.

2 Приготовить 150 мл плотной питательной среды.

Последовательность приготовления питательной среды с использованием сухого питательного агара следующая:

2.1 Налить в 250-мл стерильную колбу 150 мл дистиллированной воды.

2.2 Взвесить на **весах лабораторных MWP-1500** (см. руководство по эксплуатации) нужное количество питательной среды (5 г из расчета на 100 мл)*.

2.3 Засыпать сухой питательный агар в холодную воду.

2.4 Тщательно размешать. Для этого поставить колбу с содержимым на **магнитную мешалку ИКА С-MAG HSJ IKAMAG** (см. руководство по эксплуатации). Закрыть колбу ватной пробкой, соблюдая приемы поддержания стерильности.

2.5 Поставить колбу со средой на электрическую плитку либо **водяную баню BWT-U** (см. руководство по эксплуатации). Довести среду до полного растворения агара, не допуская его пригорания.

2.6 Простерилизовать среду на **паровом стерилизаторе, модель LAC-3010/E** (см. инструкцию по эксплуатации).

2.7 Остудить среду до 45 °С.

2.8 С соблюдением приемов стерильности в **боксе абактериальной воздушной среды «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1.2** (см. руководство по эксплуатации) разлить среду по 25 мл в стерильные чашки Петри.

2.9 Дать застыть агаризованной среде.

*Примечание: 1) взвешивание реактивов в мг следует проводить на **весах аналитических (Ohaus)**; 2) Измерение pH питательной среды выполнять на **ионметре И-160 МП** (см. руководство по эксплуатации).

Занятие 2

Способы культивирования микроорганизмов

- 1 Понятие о культивировании микроорганизмов
- 2 Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов
- 3 Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды
- 4 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

1 Понятие о культивировании микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов, помимо состава питательной среды, сильно зависит от физических и химических факторов (температуры, кислотности, аэрации, света и т. д.). При этом количественные показатели каждого из них неодинаковы и определяются особенностями метаболизма каждой группы бактерий.

Можно выделить методы культивирования на твердых и в жидких питательных средах; в аэробных, анаэробных и микроаэрофильных условиях. Характеристики этого процесса устанавливают путем измерения таких показателей как число клеток или их биомасса.

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют различными методами.

Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется *посевом*, или *инокуляцией*.

Посев микроорганизмов требует соблюдения определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами. Перед посевом следует сделать надписи на посуде. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей или иглой, если микроорганизмы выращивали на плотной среде. В случае, когда микроорганизмы выращены в жидкой среде, лучше пользоваться пипеткой.

После пересева пробирки или другие сосуды с микроорганизмами помещают в термостаты с определенной температурой.

По окончании работы посуду с культурами микроорганизмов, подлежащими выбрасыванию, следует автоклавировать, чтобы убить клетки, и только после этого мыть. Допускается заливать

дезинфицирующим раствором поверхность плотных сред. Через сутки среды можно выбрасывать и посуду мыть. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.

2 Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов

Культивирование аэробных микроорганизмов проводят следующим образом:

- на поверхности плотных сред или в тонком слое жидких сред, когда микроорганизмы получают кислород прямо из воздуха;
- в жидких средах (глубинное культивирование). В этом случае микроорганизмы используют растворенный в среде кислород. В связи с низкой растворимостью кислорода, для обеспечения роста аэробных бактерий в толще среды, требуется постоянное аэрирование.

Наиболее простой и широко используемый в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на шейкерах, обеспечивающих встряхивание колб или пробирок со скоростью 100–200 об/мин и более. В работе удобно использовать **термостат-шейкер ES-20/60** (см. руководство по эксплуатации). Помимо перемешивания, аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием под давлением через толщу среды стерильного воздуха.

Граница между аэробными и анаэробными микроорганизмами является относительно условной. Хотя **облигатными анаэробами** обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода, на практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении.

Аэротолерантные бактерии хорошо растут на поверхности агара и чашках при низком уровне кислорода. Степень анаэробнозиса измеряется по окислительно-восстановительному (редокс, Eh) потенциалу среды. При увеличении Eh выше 100 мВ, обусловленном присутствием растворимого кислорода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. Для удаления кислорода и создания соответствующих условий среды можно воспользоваться следующими методами:

1 **Культивирование в микроанаэроостате**, например, **анаэроостате АЭ-01** (см. паспорт) – аппарате для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью. Наиболее часто используемая смесь имеет следующий состав: азот с 5 % CO₂ и 10 % H₂.

2 Использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород. В качестве поглотителей молекулярного кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пиросульфата натрия, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора с притертой крышкой, а также анаэробные бактерии, засеянные в колбу, пробирку или чашку Петри. При таком способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращиваются бактерии.

3 Использование восстанавливающих агентов, которые добавляют для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота. Удаления кислорода из среды можно добиться и в результате быстрого нагревания и кипячения среды с последующим быстрым охлаждением. Если в такую среду засеять анаэробные микроорганизмы и наслоить смесь (1:1) масла и парафина, то в подобных условиях будет наблюдаться рост нестрогих анаэробов.

4 Выращивание совместно с аэробными или факультативно-анаэробными бактериями. В жидкой среде с восстанавливающими агентами перед инокуляцией анаэроба проводят культивирование, например, *E.coli*, что приводит к удалению из среды остаточного кислорода. Перед инокуляцией анаэробов клетки *E.coli* убивают нагреванием.

Существует и другая модификация метода. На половине чашки Петри засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой – анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется после полного использования кислорода аэробом.

Для культивирования анаэробных бактерий используют и другие методы, ограничивающие доступ воздуха к растущей культуре:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;
- культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в среду уменьшается с увеличением ее плотности;
- заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина;
- культивирование в **термостат CO_2 –инкубаторе** (см. руководство по эксплуатации).
- самый современный и эффективный метод работы с анаэробными бактериями – выполнять работу по получению первичной и

перевиваемых культур, их культивированию для накопления биомассы, с использованием **анаэробной рабочей станции SIMPLICITY 888** (см. руководство по эксплуатации).

3 Техника посева микроорганизмов в жидкие питательные среды

Посев микроорганизмов обычно осуществляется бактериологической петлей.

Отбор клеток микроорганизмов производят следующим образом. В правую руку берут петлю и стерилизуют ее нагреванием в пламени спиртовки. Пробирку с культурой берут в левую руку таким образом, чтобы поверхность питательной среды с выросшими колониями микроорганизмов была хорошо видна. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают наружный конец ватной пробки к ладони и вынимают пробку из пробирки. Края открытой пробирки слегка обжигают в пламени горелки, вводят в пробирку стерильную петлю. Петлю охлаждают прикосновением к внутренней поверхности стекла пробирки или на свободной от микроорганизмов части среды и после этого захватывают небольшое количество микробной биомассы. Осторожно вынимают петлю из пробирки, горлышко пробирки вновь обжигают, ватную пробку проводят над пламенем спиртовки и закрывают ею пробирку. Пробирку с культурой помещают в штатив, а извлеченную культуру переносят в жидкую питательную среду, находящуюся в другой пробирке или колбе.

Оставшиеся на петле после пересева клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. В этом случае прокаливание петли начинают с участка проволоки, ближе к основанию держателя, чтобы клетки, оставшиеся на петле, подсохли и не образовали аэрозоль, загрязняющий воздух. Затем петлю переводят в вертикальное положение, прокаливают докрасна и только после этого ставят на место.

4 Техника посева микроорганизмов на агаризованную среду

Посев на *скошенный агар* в пробирках проводят следующим образом. Клетки микроорганизмов отбирают бактериологической петлей (как описано в п. 3) и вводят петлю в пробирку со скошенной агаризованной средой почти до дна. Слегка прикасаясь петлей к поверхности среды, проводят от дна вверх зигзагообразную или прямую черту-штрих.

Посев на *поверхность агаризованной среды в чашках Петри* можно производить с помощью бактериологической петли, микробиологического шпателя или методом реплик. При посеве петлей отбирают клетки микроорганизмов с агаризованной или жидкой среды, приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхности среды проводят штрихи, после чего чашку закрывают и помещают в термостат крышкой вниз.

При посеве микроорганизмов *из жидкой среды с использованием микробиологического шпателя* поступают следующим образом. Для этого вынимают пипетку за верхний конец из бумаги, насаживают резиновую грушу. На поверхность среды в чашке наносят с помощью стерильной пипетки заданный объем жидкой культуры. Одновременно вращая чашку и проводя круговые движения стерильным шпателем, суспензию распределяют по поверхности среды. После использования пипетку немедленно переносят в дезинфицирующий раствор (хлорамина, фенола), не касаясь ею окружающих предметов.

При пересеве микроорганизмов *методом реплик* используют стерильные кусочки бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на специальный столик для реплик, диаметр которого меньше диаметра чашки Петри, и закрепляют металлическим кольцом. Чашки Петри с агаризованной питательной средой и сформировавшимися колониями микроорганизмов накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают. Чашку осторожно снимают, а бархат с отпечатками колоний после этого может служить исходным штампом для засева других чашек со средой. Возможно снятие отпечатков на серию чашек, содержащих различные среды. В качестве контроля в последнюю очередь производится отпечаток на чашку Петри с исходной питательной средой.

При *глубинном посеве* микроорганизмов в агаризованную питательную среду ее предварительно разливают по 15–20 мл в пробирки и стерилизуют. После охлаждения расплавленной среды до 48–50 °С в каждую пробирку стерильной пипеткой вносят по 0,1–1,0 мл жидкой культуры микроорганизмов. При необходимости готовят серию разведений культуры микроорганизмов с таким расчетом, чтобы при высеве получить изолированные колонии. Содержимое пробирки перемешивают путем ее вращения между ладонями и быстро выливают в чашку Петри. После застывания среды чашки помещают в термостат.

В некоторых особых случаях используют выращивание бактерий в *полужидких средах*. Такая среда пригодна для культивирования микроаэрофильных бактерий, изучения подвижности клеток и хемотаксиса. При использовании 0,1–0,4 % агара, гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки

не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои в данном случае является диффузия, что создает градиент концентрации кислорода. При инокуляции среды в пробирке уколом петлей, микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Анаэробы начинают расти в нижней части полужидкой среды.

Все описанные выше манипуляции проводят около пламени горелки, по возможности быстро, чтобы не загрязнять культуру посторонними микроорганизмами.

Не рекомендуется делать резкие движения, ходить около проводящего посев, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного загрязнения культуры.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Дайте общее представление о культивировании микроорганизмов.
- 2 Каково отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду?
- 3 Перечислите способы культивирования аэробных микроорганизмов.
- 4 Перечислите способы культивирования анаэробных микроорганизмов.
- 5 Охарактеризуйте технику посева микроорганизмов в жидкие питательные среды.
- 6 Охарактеризуйте технику посева микроорганизмов на агаризованные среды.

Практическое занятие 2

Цель: ознакомление со способами культивирования микроорганизмов, техникой посева на (в) питательные среды.

Материалы и оборудование: бактериальные петли (иглы), бактериальные шпатели, стакан со спиртом, колбы (пробирки) с ватными пробками, чашки Петри, стерильные пипетки, спиртовки, спички.

Ход работы

1 Отработать приемы посева плотной культуры клеток с одной пробирки (колбы), закрытых ватными пробками, в другую; с одной чашки Петри – в другую.

2 Отработать приемы посева жидкой культуры клеток с одной пробирки (колбы), закрытых ватными пробками, в другую, либо в чашку Петри. Задание 1 и 2 выполнить в **боксе абактериальной воздушной среды «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2** (см. руководство по эксплуатации).

3 Нарисовать в рабочей тетради схему распределения прокариот в зависимости от их отношения к молекулярному кислороду.

4 Ознакомиться со способами культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов, записать их в рабочей тетради.

5 Ознакомиться с оборудованием микробиологической лаборатории, используемом для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов: соответственно, **термостат суховоздушный ТС-1-80-СПУ** (см. руководство по эксплуатации), **термостат-шейкер ES-20/60** (см. руководство по эксплуатации) и **анаэростат АЭ-01** (см. паспорт), **анаэробная рабочая станция** (см. руководство по эксплуатации),

6 Охарактеризовать рост бактерий в жидкой среде с различным отношением к молекулярному кислороду в соответствии с рисунком 2.1. Рисунок зарисовать в рабочую тетрадь и соответственно подписать группы прокариот в зависимости от отношения к молекулярному кислороду.

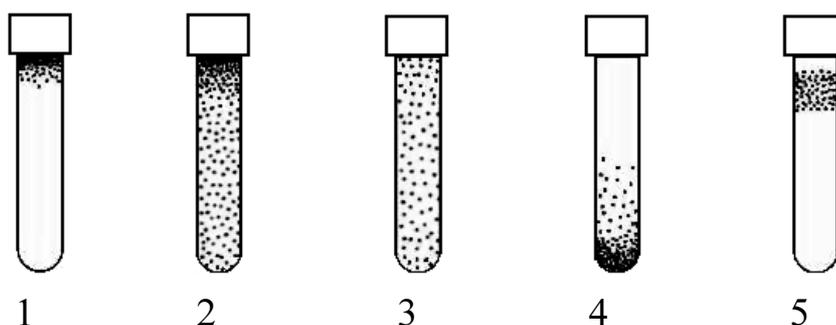


Рисунок 2.1 – Иллюстрация роста бактерий в жидкой среде с различным отношением к O_2

7 Предложить различные варианты посева микроорганизмов (рисунок и расположение штрихов) бактериологической петлей на агаризованную среду: а) в чашке Петри; б) в микробиологической пробирке. Рисунки зарисовать в рабочую тетрадь.

Занятие 3

Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха

- 1 Микрофлора воздуха, ее изучение
- 2 Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха
- 3 Изучение культуральных особенностей микроорганизмов

1 Микрофлора воздуха, ее изучение

Воздух – среда, наименее благоприятная для жизни микроорганизмов. Микробные клетки и их споры попадают в воздух из почвы или воды вместе с пылью и аэрозолем (**аэрозоль** – коллоидная система, состоящая из воздуха, капелек жидкости или твёрдых частиц, и включающая различные микроорганизмы; размер аэрозольных частиц варьирует от 10 до 2000 нм). Хорошая освещенность воздуха солнечными лучами УФ-спектра, отсутствие питательных веществ и влаги – все эти условия не способствуют жизни микробов в воздухе. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивают взвешенные частицы воды, слизи, пыли и фрагментов почвы.

Атмосферный воздух и воздух закрытых помещений значительно различаются по количественному и качественному составу микрофлоры. Бактериальная обсеменённость жилых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха; это справедливо и в отношении патогенных микроорганизмов, попадающих в воздух от больных людей, животных и бактерионосителей.

Микрофлору атмосферного воздуха условно разделяют на **резидентную** (постоянно обнаруживаемую) и **временную** (обнаруживают спорадически). Наибольшее количество микробов содержится в околосемных слоях атмосферы. По мере удаления от земной поверхности воздух становится чище.

Постоянная микрофлора атмосферного воздуха формируется почвенными микроорганизмами. Более или менее регулярно в её состав входят *Micrococcus roseus*, *M. flavus*, *M. candidam*, *Sarcina flava*, *S. alba*, *S. rosea*, *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, виды *Actinomyces*, *Aerococcus*, грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.

Временная микрофлора атмосферного воздуха также формируется за счёт микроорганизмов почвы и видов, поступающих с поверхности водоёмов. Находящиеся в атмосферном воздухе микроорганизмы подвергаются солнечному и температурному

воздействию, атмосферным осадкам и ветру. Поэтому микрофлора воздуха весьма динамична, непрерывно меняется и обновляется.

Контаминация воздуха патогенными микроорганизмами происходит капельным путём; микробы содержатся в составе аэрозоля, образующегося при разговоре, кашле, чихании. Также микроорганизмы попадают в воздух со слущивающимся эпителием кожных покровов, пылью из загрязнённого постельного белья и заражённой почвы.

При оценке санитарного состояния закрытых помещений в зависимости от задач исследования, определяют общее микробное число, наличие санитарно-показательных микроорганизмов (стафилококков, гемолитических стрептококков, являющихся показателями контаминации микрофлорой носоглотки человека). Кроме того, при исследовании воздуха медицинских стационаров (родильные дома) основное внимание направлено на выявление патогенных стафилококков, синегнойных палочек, других условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций. На предприятиях микробиологической промышленности выявляют наличие и содержание микроорганизмов-продуцентов. Определение тех или иных патогенных или условно-патогенных микроорганизмов из воздуха проводят на специальных дифференциально-диагностических средах. Изучение состава микрофлоры воздуха имеет большое значение для санитарной оценки этой среды.

2 Количественный и качественный учет микрофлоры воздуха

Количественный учет микрофлоры воздуха. Для исследования общего количества микроорганизмов в воздухе применяют наиболее простой, хотя и недостаточно точный, метод «оседания» (**седиментационный метод**), предложенный Кохом (1881). Стерильные чашки Петри с питательной средой (МПА (мясо-пептонный агар) – для бактерий, СА (сусловый агар) – для грибов) открывают в исследуемом помещении на 5 минут (чашки располагают на высоте, соответствующей уровню дыхания сидящего или стоящего человека). Следят за тем, чтобы при открывании крышки чашки Петри не было движения воздуха. После этого чашки закрывают и помещают на сутки в термостат при 37 °С, что дает возможность развиваться бактериальной флоре. Затем чашки переставляют в термостат и выдерживают при температуре 25 °С. В таких условиях прорастают бактерии, требующие для своего развития более низкие температуры, а также плесневые грибы. Обычно опыт ставится в двух повторностях. Затем подсчитывают выросшие колонии микроорганизмов. Счет колоний на чашках производят с помощью прибора для счета колоний бактерий

или лупы. Для лучшей видимости считают колонии на темном фоне (под чашку кладут темную бумагу), чашки помещают дном кверху. Каждую колонию отмечают на две чашки чернилами или тушью.

Седиментационный метод – самый простой метод для суждения о зараженности воздуха микроорганизмами, но он позволяет иметь лишь ориентированное представление о содержании микрофлоры в воздухе. С его помощью определяется только **35-60% микроорганизмов в воздухе**. Хотя этот метод и не дает полного представления ни о количестве микроорганизмов, находящихся в воздухе, ни об их видовом разнообразии, однако с его помощью можно учесть микрофлору тяжелой оседающей пыли, которая не захватывается и не учитывается другими аспирационными методами. Метод не точен и абсолютно не пригоден для изучения атмосферного воздуха, где имеют место большие колебания в скорости его движения. Этот метод может быть использован для анализа микрофлоры воздуха в закрытых помещениях в тех случаях, когда отсутствуют более совершенные приборы или нет электроэнергии.

Используя данный метод можно рассчитать количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Обычно производят перерасчет по Омелянскому: допускают, что на площадь в 100 см² за 5 мин осаждаются примерно столько бактерий, сколько их содержится в 10 л воздуха (0,01 м³). Зная площадь чашки Петри, определяют количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Для этого: 1) определяют площадь агаровой пластинки в чашке Петри по формуле $S = \pi \times r^2 = 3,14 \times r^2$ (радиус чашки Петри равен 0,5 дм, соответственно, площадь агаровой пластинки равна 0,785 дм²); 2) вычисляют количество колоний на площади 1 дм²; 3) пересчитывают количество бактерий на 1 м³ воздуха, умножая найденное количество колоний на площади 1 дм² на 100; 4) результаты определения микробного числа воздуха оценивают по суммарному числу колоний, выросших на обеих чашках; 5) обязательно учитывают, что полученные показатели занижены примерно в 3 раза.

Чтобы судить о степени загрязненности воздуха жилых помещений, можно воспользоваться таблицей 3.1.

Таблица 3.1 – Критерии для санитарной оценки воздуха жилых помещений (число микроорганизмов в 1 м³ по А.И. Шафиру)

Оценка воздуха	Летний режим	Зимний режим
чистый	менее 1500	менее 4500
грязный	более 2500	более 7000

По данным А. Ф. Войткевича, в 1 м³ морского воздуха содержится 1–2 клетки, в таком же объеме воздуха в городском парке – 200, городской улице – 5 тыс., жилом помещении – 20 тыс., скотном дворе – более 1 млн. клеток.

Для исследования микрофлоры воздуха можно использовать различные аспирационные методы, например, аппарат Кротова, работа которого основана на принципе ударно-прибивного действия воздушной струи. Подобные методы наиболее надежны и точны.

При качественном анализе микрофлоры воздуха отмечают культуральные особенности роста микроорганизмов на плотных питательных средах, общее количество типов колоний, их морфологические особенности и количественное соотношение. Отдельные колонии микроскопируют с иммерсионной системой либо пересевают на дифференциально-диагностические питательные среды для выделения чистых культур микроорганизмов, видовой состав которых можно определить, используя специальные определители.

3 Изучение культуральных особенностей микроорганизмов

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

Рост на плотных питательных средах. На поверхности плотных питательных сред микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии. Колонии, выросшие на поверхности среды, отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

– **форму колонии** – округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и т.д. (рисунок 3.1);

– **размер (диаметр) колонии** измеряют в мм. Если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

– **поверхность колонии** – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

– **профили колонии** – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д. (рисунок 3.2);

– *блеск и прозрачность* – колония блестящая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

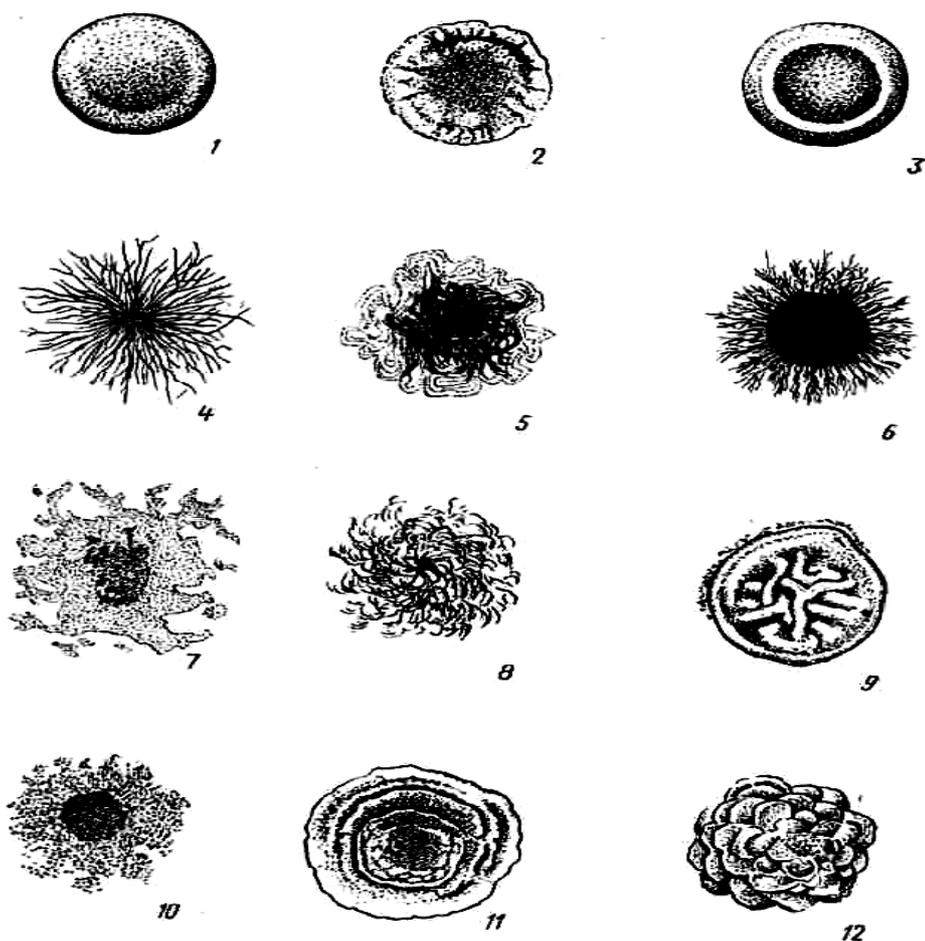


Рисунок 3. 1 – Форма колоний: 1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем; 7 – амебовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

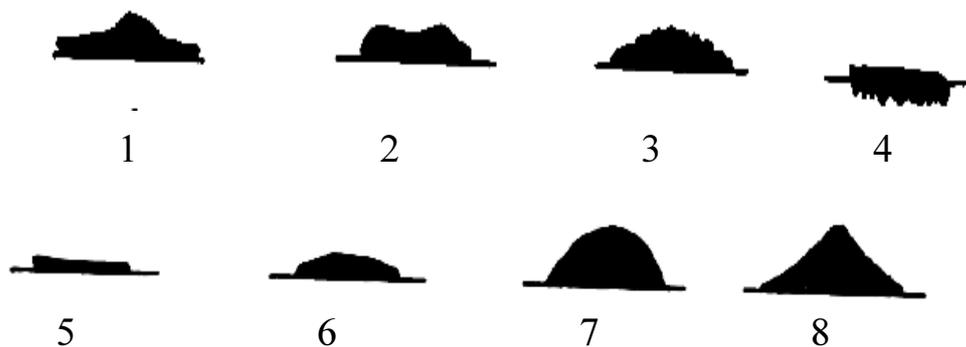


Рисунок 3.2 – Профиль колонии: 1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – растающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный

– **цвет колонии** – бесцветная (грязно-белые колонии относятся к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, красная, черная и др. Отмечают выделение пигмента в субстрат. При описании колоний актиномицетов отмечают пигментацию воздушного и субстратного мицелия, выделение пигментов в среду;

– **край колонии*** – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д. (рисунок 3.3);

– **структура колонии*** – однородная, мелко- и крупнозернистая, струйчатая и т.д. (рисунок 3.4);

*Край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку помещают на столик крышкой вверх.

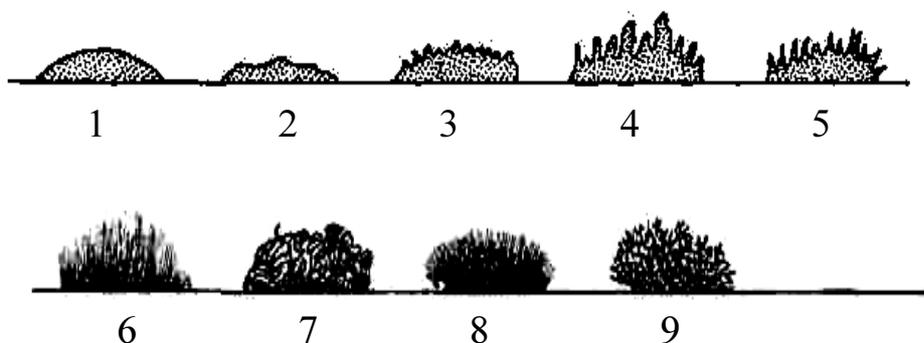


Рисунок 3.3 – Край колонии: 1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной; 5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый; 8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

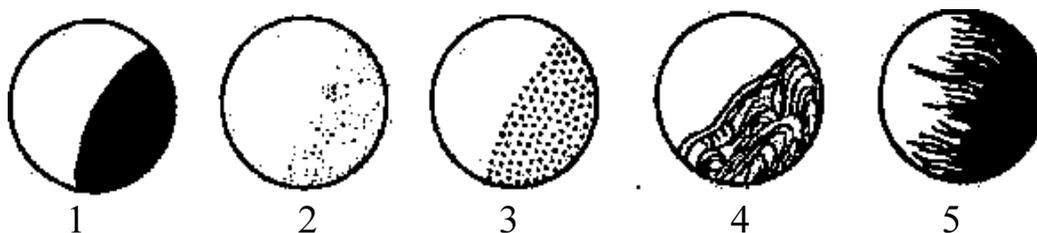


Рисунок 3.4 – Структура колонии: 1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая; 4 – струйчатая; 5 – волокнистая

Консистенцию колонии определяют, прикасаясь к ее поверхности петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или растающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей,

пленчатой (снимается целиком), хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

При посеве клеток в толщу плотной питательной среды наряду с поверхностными колониями наблюдается образование глубинных и донных колоний.

Глубинные колонии довольно однообразны. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции имеющие форму овалов с заостренными концами. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если развивающиеся микроорганизмы выделяют углекислоту и другие газы.

Донные колонии образуются при соприкосновении агаризованной среды с дном чашки Петри. Эти колонии обычно имеют вид довольно крупных, бесцветных прозрачных налетов либо вид тонких прозрачных пленок, стелящихся по дну.

Размеры и некоторые другие особенности колоний изменяются с возрастом и зависят от состава среды.

При описании **роста микроорганизмов по штриху** отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный (рисунок 3.5). Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию. При описании колонии и роста микроорганизмов по штриху обязательно указывают состав среды и возраст культуры, так как колонии одного и того же организма на различных средах могут отличаться рядом признаков.

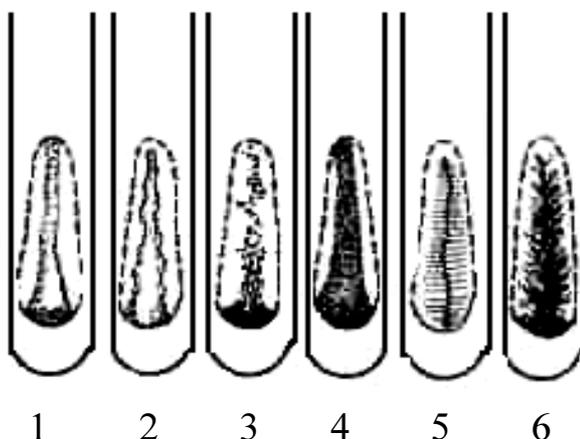


Рисунок 3.5 – Рост бактерий по штриху: 1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный

В определителях обычно приведены описания колоний и роста микроорганизмов по штриху только на мясо-пептонном агаре или мясо-пептонной желатине.

Рост в жидких питательных средах. Рост микроорганизмов в жидких питательных средах при стационарных условиях культивирования характеризуется большим единообразием по сравнению с ростом на плотных средах. Он сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост в жидкой среде, отмечают:

- *степень помутнения* – слабая, умеренная или сильная;
- *особенности пленки* – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая;
- при *образовании осадка* указывают – скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый, хлопьевидный;
- нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа (последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков).

Для описания характера роста в жидких средах хемоорганогетеротрофные микроорганизмы выращивают на МПБ (мясопептонном бульоне) или на другой среде, обеспечивающей хороший рост этого организма. Чаще всего используют 4–7–суточные культуры.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Насколько точным является учет микрофлоры воздуха методом «оседания» на агаровые пластинки?
- 2 Какие факторы влияют на количество микроорганизмов в воздухе помещений?
- 3 Какие микроорганизмы обычно составляют микрофлору воздуха помещений?
- 4 Каково санитарное значение изучения состава микрофлоры воздуха помещений?
- 5 Охарактеризуйте седиментационный метод количественного учета микрофлоры воздуха.
- 6 Каким образом производится методика расчета количества микроорганизмов в 1 м³ воздуха?
- 7 Перечислите основные признаки колоний, выросших на поверхности среды.

- 8 Какие факторы влияют на размеры и особенности роста колоний?
- 9 Охарактеризуйте рост микроорганизмов в жидких питательных средах.

Практическое занятие 3

Цель: ознакомление с методами бактериологического исследования микроорганизмов; выполнение количественного и качественного учета микрофлоры воздуха помещений.

Оборудование и материалы: чашки Петри со стерильной агаризованной питательной средой, чашки Петри с культурами предыдущего занятия, стерильная водопроводная вода в пенициллиновой бутылочке – 3 мл, бактериологические петли, бактериологический шпатель, лупы, спиртовки, спички, стеклянные палочки, стерильные пипетки на 1 мл, маркер, измерительные линейки.

Ход работы

1 Не открывая чашку Петри, рассмотреть выросшие колонии. Выбрать одну колонию того морфологического типа, который преобладает в данном посеве.

2 С соблюдением стерильности, выполнить пересев бактериальной петлей клеток отобранной колонии на свежую среду в чашках Петри. Рассев бактерий произвести методом истощающего штриха.

3 Поместить пробирки с материалом в **термостат ТС-1-80-СПУ** (см. руководство по эксплуатации) при температуре 25 °С для инкубирования микроорганизмов.

4 Открыв чашку Петри, произвести визуальное обследование колоний микроорганизмов с использованием лупы.

5 Выполнить количественный учет микрофлоры воздуха в соответствии с описанными указаниями п. 2 настоящего руководства. При подсчете колоний использовать **счетчик колоний Funke Gerber**. Рассчитать количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха. Оценить степень загрязнения воздуха исследуемого помещения. Сделать соответствующие записи и расчеты в рабочей тетради.

6 Выполнить качественный учет микрофлоры воздуха по макроморфологическим свойствам согласно п. 3 настоящего руководства. Для рассмотрения признаков колоний использовать лупу.

7 Полученные данные записать в таблицу 3.2, сгруппировав колонии по морфологическим типам.

8 Выполнить рисунки каждого регистрируемого морфологического типа колоний.

Таблица 3.2 – Признаки колоний микроорганизмов, выросших на питательной среде

№ колоний	Форма	Диаметр, мм	Блеск, прозрачность	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Рисунок колонии
1										
2										
3										
·										
·										
n										
Общее число всех регистрируемых колоний на чашке Петри										
Число разных типов колоний										
Количественное соотношение колоний разных типов										
Выводы:										

9 Отметить: 1) общее количество всех регистрируемых колоний на чашке Петри; количество разных типов колоний; рассчитать количественное соотношение колоний разных типов. Полученные данные записать в таблицу 3.1.

10 Сделать выводы: указать количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха исследуемого помещения, оценить степень его загрязнения; отметить разнообразие микрофлоры воздуха в анализируемом помещении.

Занятие 4

Выделение чистых культур микроорганизмов

- 1 Понятие «чистые культуры микроорганизмов»
- 2 Методы получения накопительной культуры
- 3 Методы выделения чистой культуры
- 4 Способы определения чистоты выделенной культуры
- 5 Массовая культура на плотной среде

1 Понятие «чистые культуры микроорганизмов»

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются довольно редко. Тем не менее, основная часть современных представлений о свойствах бактерий, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому совершенно необходимой задачей является выделение чистых культур различных видов бактерий, существующих в естественных условиях. Для выделения чистых культур большинства бактерий обычно затрачивается не более 2–3 суток, однако для некоторых (например, бактерии туберкулеза), этот процесс может затягиваться до 4–6 недель. **Чистой культурой микроорганизмов** называют популяцию бактерий одного вида, представляющую потомство одной клетки. Выделение чистой культуры предполагает проведение трех этапов (рисунок 4.1): 1) получение накопительной культуры; 2) выделение чистой культуры; 3) определение чистоты выделенной культуры.

2 Методы получения накопительной культуры

В основе выделения и определения численности представителей отдельных групп микроорганизмов лежит получение накопительных культур с помощью создания селективных условий. **Накопительными** называют такие **культуры**, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов. **Селективными** называют **условия**, обеспечивающие преимущественное развитие определенной группы или вида микроорганизмов. При создании селективных условий учитывают особенности физиологии и метаболизма микроорганизмов: требования их к источникам питания, отношение к кислотности среды, аэрации, температуре, способность к

образованию эндоспор и т.д. Особенно часто элективные условия создают путем подбора соответствующей питательной среды.

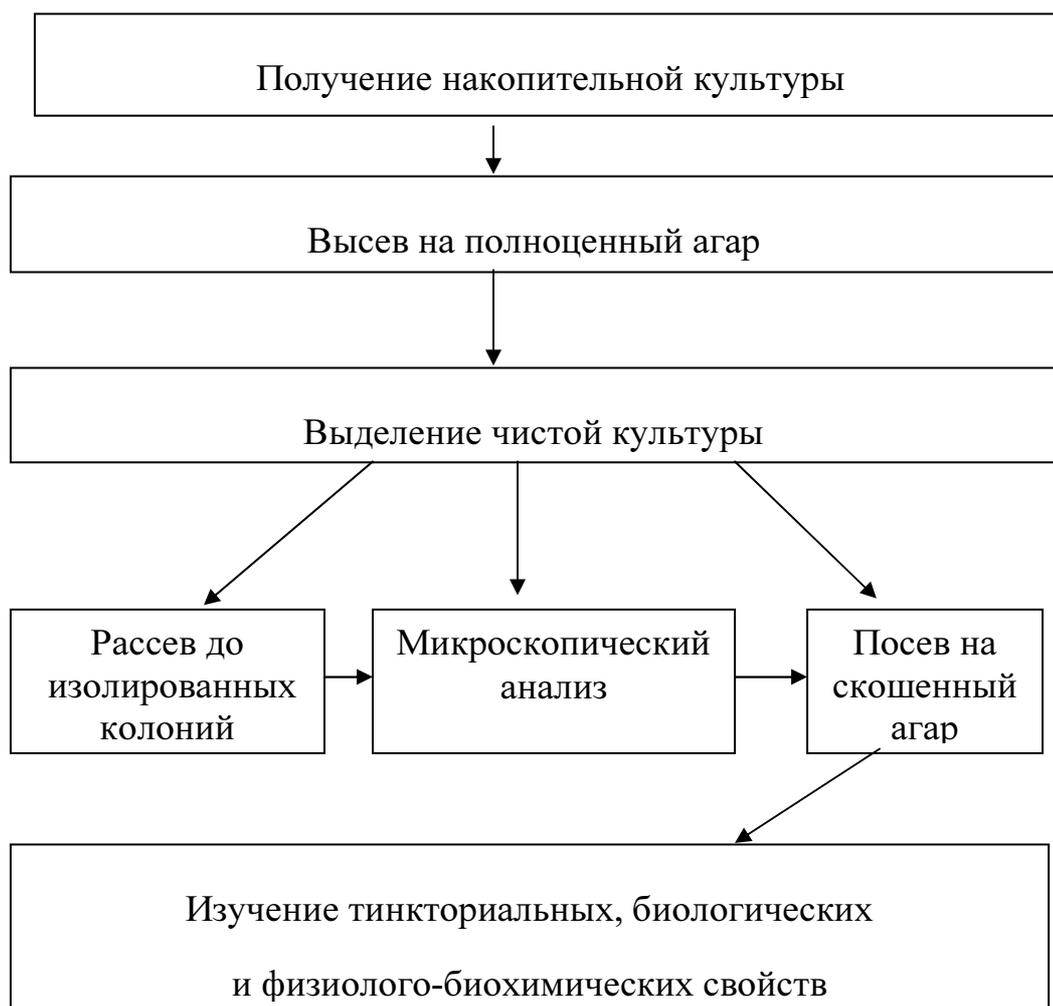


Рисунок 4.1 – Этапы выделения чистых культур микроорганизмов

Источником для получения бактериальных культур, родовую и видовую принадлежность которых необходимо определить, могут служить почва, воздух, вода, пищевые продукты, надземные и подземные части растений, а также различные тканевые жидкости животных и человека, отделяемое ран, слизистой оболочки и т.д.

Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма за счет создания благоприятных условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его из популяции.

К **физическим методам**, которые могут быть использованы при получении накопительной культуры, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение и др. Можно использовать также и особенности некоторых других физических свойств данного

микроорганизма, например, его размеры, подвижность, что позволяет отделять данный микроорганизм от других членов популяции. В качестве примеров можно привести следующие:

– **использование освещения для получения культур цианобактерий.** Такие виды легко выделяются из пресной воды и морских осадков. Для получения накопительных культур, образцы инкубируют при 25 °С и постоянном освещении от 500 до 3000 лк. Через 4–7 дней наблюдается увеличение мутности культуры, имеющей часто розовую, коричневую, желтую окраску;

– **инкубация при низкой температуре для получения культур психрофильных бактерий.** Низкая температура способствует задержке роста многих бактерий. На первом этапе проводят инкубирование при температурах 0–5 °С в течение 14–24 дней.

При использовании химических методов применяют токсические вещества, которые убивают или подавляют рост оставшейся части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, эти вещества могут быть источниками питания, используемыми преимущественно отдельными бактериями в смешанной популяции.

Примерами использования химических методов для выделения микроорганизмов являются следующие:

– **условия инкубирования в кислой среде для выделения культур лактобацилл.** Для выделения бактерий из сыров, высеив производится на среду, которая за счет ацетатной буферной системы имеет рН, равный 5,3. В этом случае *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* способны образовывать колонии, а другие молочнокислые бактерии – нет;

– **ингибирование роста пенициллином для получения культур микоплазм.** Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они устойчивы к высоким концентрациям пенициллина, который подавляет рост многих бактерий с клеточной стенкой. Антибиотик, добавленный к питательной среде в концентрации 100–200 Е/мл, позволяет избавиться от посторонней чувствительной к нему микрофлоры;

– **целлюлоза как субстрат для цитофаг.** Для получения накопительных культур цитофаг, разлагающих целлюлозу, на поверхность основного минерального агара помещают кусочки фильтровальной бумаги. На бумагу кладут частицы почвы или растительного материала и инкубируют чашки при комнатной температуре. Следят за образованием вокруг частиц желтой, оранжевой или розовой окраски, а также за процессом лизиса бумаги.

Биологические методы включают использование специфических хозяев выделяемого микроорганизма, а также преимуществ некоторых свойств патогенных микроорганизмов. К ним относятся, например, такие методы как:

1 Получение накопительной культуры бактерий, патогенных для животных организмов. Патогенные для животных бактерии можно выделить, заражая восприимчивое животное-хозяин смешанной культурой исследуемого материала, в котором предполагается его присутствие. В инфицированном животном патогенный микроорганизм часто преобладает и обнаруживается в крови и тканях в виде чистой культуры. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется и они гибнут. Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4–6 часов после внутрибрюшинного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *Streptococcus pneumoniae*. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшинной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

2 Симбиоз растений с *Rhizobium*. Клубеньки, образуемые на корнях бобовых растений, представляют собой природную накопительную культуру симбиотических азотфиксирующих бактерий. Корни бобовых растений, содержащие клубеньки, промывают и отделяют часть корня с клубеньками. После поверхностной стерилизации корень помещают в воду, раздавливают пинцетом в одной чашке Петри, 1–2 петли такой суспензии переносят в следующую чашку и т. д. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный агар с маннитом. После застывания агара чашки инкубируют при оптимальной температуре.

Во многих случаях для получения накопительной культуры определенных бактерий используют сочетание физических, химических и биологических методов.

3 Методы выделения чистой культуры

Для выделения бактерий в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего это делают путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, используя метод посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры (**метод предельных разведений**). Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но и из их

скоплений. Если микроорганизмы образуют слизь, то часто к ней прикрепляются посторонние формы. Для очистки предпочтительно использовать неселективную среду (МПА), поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить.

Получение изолированных колоний на твердой питательной среде достигается либо путем посева взвеси микроорганизмов шпателем (**метод Коха**), либо с помощью бактериологической петли (**метод истощающего штриха**). В результате механического разобщения клеток микроорганизмов каждая из них может дать начало изолированной колонии одного вида микробов.

Рассев шпателем (метод Коха) производят в следующей последовательности:

1) на поверхность питательной среды в чашке № 1 наносят стерильной пипеткой каплю накопительной культуры и распределяют ее стерильным шпателем;

2) шпатель достают, чашку быстро закрывают и переносят шпатель в чашку № 2, не стерилизуя его. Имитируют распределение культуры по всей поверхности среды, прикасаясь к ее поверхности той же стороной шпателя, которой ранее распределяли пробу;

3) точно те же действия проводят и в чашке № 3, после чего шпатель стерилизуют;

4) засеянные чашки помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре.

Через определенное время чашки достают из термостата и изучают рост микроорганизмов. Обычно в чашке № 1 наблюдают сплошной рост бактерий, в последующих чашках отмечают колонии.

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает высев бактериологической петлей из накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рисунок 4.2, *А*). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рисунок 4.2, *Б*). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении *В* (рисунок 4.2), а после очередной стерилизации – в направлении *Г* (рисунок 4.2). Чашки помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах *А* и *Б* вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах *В* и *Г* формируются изолированные (отдельные) колонии.

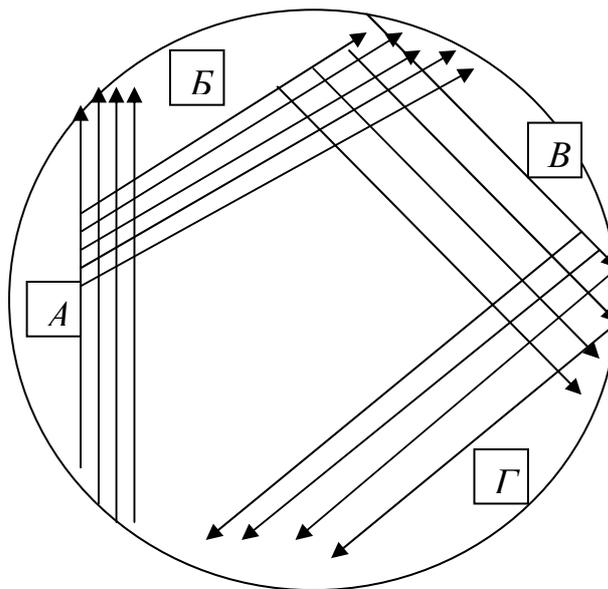


Рисунок 4.2 – Схема посева бактерий штрихами для получения изолированных колоний

Последовательные разведения в твердой среде – самый простой способ посева по чашкам, который заключается в том, что после инокуляции пробы в пробирку со стерильным расплавленным и охлажденным агаром, среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают ей застыть.

Для получения хорошо изолированных колоний готовят ряд последовательных десятикратных разведений и по 1 мл проб вносят сразу в чашку, добавляют 15–20 мл расплавленной агаризованной среды и смешивают, покачивая чашку. Иногда отдельные колонии оказываются погруженными в агар и извлечь их можно только механически. Плохо и то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара.

4 Способы определения чистоты выделенной культуры

Выросшие изолированные колонии отсевают бактериологической петлей на поверхность скошенной агаризованной среды в пробирке.

Поскольку изолированные колонии иногда могут формироваться не только из отдельных клеток, обязательным этапом выделения чистой культуры должна быть проверка их однородности. Это осуществляется несколькими *способами*: визуальным, микроскопическим, высевам на соответствующие питательные среды.

При визуальном контроле исследуют рост культуры по штриху на поверхности скошенной среды; в том случае, если рост неоднороден, считают, что культура загрязнена и требуется ее дополнительная расчистка. При описании колоний бактерий определяют их диаметр в миллиметрах, пигментацию, форму, высоту, профиль, вид края, поверхность колоний, отмечают степень прозрачности колоний и их консистенцию. На характеристики колоний могут влиять среда, возраст культуры, условия культивирования.

Чистоту культур микроорганизмов обязательно нужно контролировать путем **микроскопии клеток**. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток, который микроскопируют с иммерсионной системой. Клетки чистых культур микроорганизмов, как правило, однородны по размеру и окраске по Граму. Однако следует помнить, что колонии, вырастающие из чистой культуры могут быть гладкие (*S*) и шероховатые (*R*). Кроме того, в чистых культурах многих бактерий могут появляться кокковидные клетки, цисты, споры. Наконец, многие микроорганизмы проявляют грамвариабельность.

Чистоту культуры клеток проверяют также и путем повторного **рассева (высева) на селективные среды**, обеспечивающие избирательный рост тех или иных микроорганизмов. Критерием чистоты в этом случае является однородность формирующихся при этом колоний.

5 Массовая культура на плотной среде

Выращиванием колоний на плотной среде получают максимальную плотность клеток, поскольку в данном случае жидкость находится только в межклеточном пространстве. Если инокулят сильно разбавлен, каждая клетка в результате деления дает начало отдельной колонии. Это может быть полезным для массовой культуры, если отбор колонии ведут по одному признаку. Чаще инокулят бывает не разбавлен и его равномерно распределяют по всей поверхности среды. В этом случае микроорганизмы растут в виде сплошного газона.

Массовая культура бактерий на плотной среде имеет **ряд преимуществ** по сравнению с культурой, выращиваемой в жидкой среде:

1 В случае культур, выращенных на плотной среде, нет необходимости использовать центрифугу или другие средства для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии. Особенно следует избегать центрифугирования при получении большого количества патогенных

или других вредных микроорганизмов, поскольку при этом образуются аэрозоли.

2 Массовые культуры бактерий на плотной среде относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Такие культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов, поскольку для их растворения необходимы значительно большие объемы среды. Следовательно, культуры, выращенные на твердой среде, особенно полезны для приготовления антигенов или для других целей, когда важна чистота клеточной суспензии.

3 На твердых средах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем. Например, плодовые тела миксобактерий и эндоспores определенных видов *Bacillus* образуются только при росте культур на твердой среде.

Вместе с тем, выращивание микроорганизмов на твердых средах по сравнению с культивированием в жидкой среде имеет **определенные недостатки**:

1 Твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы. Она дает возможность легко получать граммы клеток; десятки граммов выращивать уже затруднительно, а сотни граммов или килограммы клеток на твердой среде в лаборатории вырастить невозможно.

2 Твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток, т. е. культура гетерогенна в физиологическом отношении. Например, клетки в верхней части твердой аэробной среды (слой глубиной до 1000 клеток) могут находиться в условиях низкого содержания питательных веществ, но высокого содержания кислорода, в то время как в нижних слоях среды условия могут быть противоположными. Гетерогенна культура и в техническом смысле, так как клетки микроорганизмов и питательная среда распределены неравномерно.

3 Твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Определите понятие «чистые культуры микроорганизмов».
- 2 Перечислите этапы выделения чистых культур микроорганизмов.
- 3 Определите понятие «накопительные культуры микроорганизмов».

4 Что такое «элективные условия» и каким образом они создаются в лабораторных условиях?

5 Охарактеризуйте различные методы получения накопительных культур микроорганизмов, укажите примеры.

6 Охарактеризуйте методы выделения чистой культуры.

7 Охарактеризуйте этап определения чистоты выделенной культуры, и применяемые на этом этапе методы.

8 Перечислите преимущества и недостатки массовой культуры бактерий на плотной среде.

Практическое занятие 4

Цель: ознакомление с этапами выделения чистой культуры; определение чистоты выделенной исследуемой культуры: визуально, микроскопически и по однородности колоний.

Материалы и оборудование: лупа, микроскопы биологические, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, бактериальные петли, иммерсионное масло, стерильные пипетки, пинцеты, держатели, фильтровальная бумага, спички, стерильная водопроводная вода, палочки ватные гигиенические, маркеры, дистиллированная вода для промывки, промывалки, кюветы, мостики, набор готовых растворов красок в штативе, спирт 96⁰, культуры микрофлоры воздуха с предыдущего занятия.

Ход работы

1 Ознакомиться с этапами выделения чистой культуры.

2 Зарисовать в рабочей тетради схему «Этапы выделения чистых культур микроорганизмов».

3 Просмотреть выделенную на предыдущем занятии культуру микроорганизмов.

4 Определить характер роста полученной культуры по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды в соответствии с указаниями п. 3 лабораторной работы 3.

При выполнении визуального обследования микроорганизмов использовать лупу.

5 Полученные наблюдения описать согласно схеме таблицы 4.1, зарисовать рост микроорганизмов по штриху.

6 Сделать выводы об однородности колоний микроорганизмов и, соответственно, чистоте исследуемой культуры.

7 Приготовить препараты «раздавленная капля» и фиксированный (простая окраска, по Граму, на наличие спор).

Таблица 4.1 – Описание роста микроорганизмов по штриху

Свойства	Особенности роста микроорганизмов
Состав среды	
Возраст культуры	
Рост микроорганизмов по штриху	
Блеск	
Прозрачность	
Цвет	
Поверхность	
Консистенция	
Рисунок	
Выводы:	

8 Препараты микроскопировать использованием **биологического микроскопа, модель XSP–136** с объективами 10х и 100х. Отметить форму и сочетание клеток, подвижность, наличие или отсутствие спор. Сделать зарисовки.

9 Наблюдения и рисунки отметить в таблице 4.2. Под рисунком указать увеличение микроскопа.

Таблица 4.2 – Особенности морфологии клеток микроорганизмов

Свойства	Особенности морфологии клеток микроорганизмов
Состав среды	
Возраст культуры	
Форма клеток	
Сочетание клеток	
Подвижность	
Окраска по Граму	
Наличие спор	
Рисунок клеток	
Выводы:	

10 Сделать выводы о чистоте исследуемой культуры на основании микроскопирования материала.

Литература

- 1 Борисов, Л. Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
Выделение и идентификация микроорганизмов; учебно-методическое пособие / Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2003. – 36 с.
- 3 Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2002. – 100 с.
- 4 Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 799 с.
- 5 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.
- 6 Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер [и др.]. – М.: Колос, 1979. – 216 с.
- 7 Милехина, Н.В. Почвенная микробиология: учебно-метод. пособие для лабораторно-практических занятий: для студентов агроэкологического института обучающихся по направлению 110100–Агрохимия и агропочвоведение. Классификация (степень) выпускника–бакалавр / Н.В Милехина. – Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2014 – 56 с.

Для заметок

Для заметок

Для заметок

Учебное издание

Концевая Ирина Ильинична

Микробиология: культивирование и рост бактерий

Практическое руководство
для студентов специальности 1–31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Технический редактор *О.Н. Ермоленко*

Подписано в печать 11.05.2017.

Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать на ризографе.

Усл. печ. л. 2,75. Усл. краск.-отт. 2,75. Уч.-изд. л. 2,56.

Тираж 15 экз. Заказ № 0081.

Отпечатано ООО «Издательство «Десна Полиграф»

Свидетельство о внесении субъекта издательского дела в Государственный реестр издателей, изготовителей и распространителей издательской продукции.

Серия ДК № 4079 от 1 июня 2011 года
14027 г. Чернигов, ул. Станиславского, 40
Тел.: (0462)972-664